ARCHIVES ROUMAINES
DE
PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE
MICROBIOLOGIE

ARCHIVES ROUMAINES
DE
PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE
MICROBIOLOGIE

Fondées par I. CANTACUZINO

Dirigées par :

C. IONESCO-MIHĂIEŞTI, M. CIUCĂ, AL. CIUCĂ,
D. COMBIESCO et P. CONDREA

Tome 20 — 1961

Publiées par:
INSTITUTUL « Dr. I. CANTACUZINO »
SPL. INDEPENDENŢEI, 103 — BUCUREŞTI 35

Publication périodique trimestrielle

ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 20 *No. 1* *MARS 1961*

RECHERCHES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR UN FOYER DE FIÈVRE «Q» DANS UNE FERME À CARACTÈRE AGRO-ZOOTECHNIQUE

par

G. Zarnea, N. Alexandresco, Honorina Ionesco, R. Voicoulesco, Lucia Szégli, S. Perederi et P. Munteanu

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Service des Rickettsioses — et de la Station sanitaire anti-épidémique (SANEPID) d'Arad)

— Manuscrit reçu le 8 juillet 1960 —

La fièvre «Q» représente une maladie rickettsienne évoluant, le plus souvent, dans le milieu rural, chez les personnes qui sont en contact avec les animaux; elle est moins rencontrée dans les villes, en tant que maladie professionnelle (chez les ouvriers des abattoirs) ou sporadiquement chez des individus appartenant aux autres catégories de la population.

Dans le présent travail, nous relatons une partie des résultats obtenus à la suite d'une étude complexe, entreprise dans un foyer de fièvre «Q» au cours des années 1956—1958, qui a évolué dans une ferme à caractère zootechnique et agricole du rayon d'A.

Le parc d'animaux de la ferme est constitué par environ 350 vaches atteintes de tuberculose, isolées à la ferme, 60 à 80 chevaux, destinés aux travaux agricoles et les animaux péridomestiques (chiens, chèvres, poules, dindons, canards, oies et pigeons), propriété du personnel. Les environs de la ferme et spécialement la forêt d'environ 60 ha, qui la limite à l'ouest, sont peuplés par une série d'animaux, propres à la faune de la région de silvo-steppe. La ferme comprend des bâtiments de type «pavillon», avec une aile réservée au secteur administratif, des bâtiments annexes pour les organisations sociales, ainsi que pour le secteur zootechnique, les ateliers mécaniques et des logements pour les employés permanents.

Le secteur zootehnique, comprenant les étables pour les bovines, les écuries pour les cabalines, ainsi qu'une maternité pour les vaches, est situé dans la proximité des logements.

Les rapports étroits entre le personnel de la ferme et le secteur zootechnique sont encore plus évidents, si l'on tient compte que 44,71% des employés y

travaillent (garçons d'écurie, fourragers, trayeurs, gardiens d'écuries, conducteurs de chevaux et personnel affecté à la désinfection), le reste étant engagé comme mécaniciens, personnel administratif (employés de bureau ou gardiens) et ouvriers agricoles.

Indifféremment du lieu de travail, tous ces employés sont en contact, soit par leurs attributions de service, soit par des relations de famille.

Afin d'apprécier les caractéristiques du processus épizootique et enzootique il faut souligner que les vaches de cette unité, bien que gardées dans des étables séparées, vivent journellement les unes à côté des autres dans les pâturages de la forêt environnante, contact qui s'établit surtout au moment où les vaches paissent. Ajoutons que les animaux appartenant aux employés, circulent librement dans toute la ferme. De cette manière, sont créées des conditions d'interférence entre le circuit des différentes espèces d'animaux domestiques et péridomestiques d'une part et le circuit du personnel de la ferme d'autre part, de même qu'une interférence entre les animaux domestiques et la faune de la forêt voisine.

Ces conditions ont créé les prémisses nécessaires à l'apparition, sur le territoire de la ferme, des cas de fièvre « Q » chez les hommes et les animaux domestiques (d'abord sous forme de cas sporadiques non-dépistés, ensuite sous la forme d'une endémo-épizootie avec poussées à caractère épidémique et épizootique), ainsi que chez les animaux de la forêt environnante.

Pendant la période 1.III — 10.III.1956, on a enregistré sur le territoire de la ferme 22 cas de maladie, étiquettés comme grippe, congestion pulmonaire, etc.; 6 de ces cas ont été internés à l'hôpital. L'étude des particularités de la morbidité due aux maladies infectieuses pendant la période antérieure et pendant cet épisode, a montré une prévalence marquée des affections de l'appareil respiratoire (considérées comme bronchites, grippes, congestions pulmonaires, etc.), à caractère saisonnier (printemps-automne), la majorité des malades se trouvant parmi les employés du secteur zootechnique.

Considérant le profil de la morbidité évoluant dans cette unité agro-zootechnique, nos investigations ont été dirigées vers la fièvre « Q ».

Afin d'obtenir une confirmation de cette hypothèse, on a procédé, dans une première étape, à un sondage en récoltant du sang chez un nombre réduit de personnes, qui avaient présenté dans la période 1.III — 10.III.1956 des symptômes cliniques suspects de fièvre « Q », obtenant des résultats positifs de la réaction de fixation du complément (RFC) avec l'antigène *C. burnetii* (1/64—1/2048) en 55% des cas. On a également réussi à isoler du sang d'un malade une souche de *C. burnetii* (la souche Utviniș).

La confirmation sérologique et bactériologique de l'existence de la fièvre « Q » dans cette unité, nous a incités à l'étude détaillée du foyer, avec les objectifs suivants:

1. Recherches sur les particularités présentées par les maladies humaines (aspects cliniques, radiologiques et épidémiologiques).

2. L'incidence de la fièvre « Q » parmi les animaux domestiques et péridomestiques, ainsi que leur importance comme réservoir d'infection.

3. Recherches sur l'infection chez les animaux capturés aux alentours de la ferme et sur l'existence éventuelle d'un foyer naturel de fièvre « Q ».

4. Recherches concernant le diagnostic de laboratoire de la maladie chez les animaux et chez l'homme, l'isolement des souches, la dynamique de la RFC, la réaction allergique chez les animaux, etc.

Comme méthode de travail pour aborder le premier objectif nous avons employé:

— l'examen initial de tous les habitants de la ferme par la RFC, afin d'établir le fond d'endémicité au moment du début de l'étude, l'examen devant être répété à intervalles de 6 mois, associé à l'examen radiophotographique (RPH);

— l'examen clinique, sérologique et RPH de toutes les personnes qui s'adressaient au stationnaire, présentant un état fébril, céphalées et affections respiratoires de type bronchite, congestion pulmonaire, état grippal ou autres affections pouvant être confondues avec la fièvre « Q »;

— la poursuite de l'évolution clinique et radiologique dans la phase aiguë de la maladie, ainsi que l'évolution ultérieure, en rapport avec la dynamique des réactions sérologiques de diagnostic;

— l'examen médical complet, radiologique et sérologique, pour tous les nouveaux employés au moment de leur admission à la ferme.

Dans le but de faciliter l'enregistrement et la poursuite des données obtenues au cours des recherches, celles-ci ont été consignées sur des fiches spéciales, individuelles.

Nous relatons, dans ce qui suit, quelques observations épidémiologiques et épizootologiques effectuées au cours de nos recherches.

OBSERVATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Le fond de la morbidité sur lequel se sont greffés les cas de fièvre « Q », a été représenté par une série de maladies, étiquettées au premier abord comme grippe, état grippal, états fébriles, congestion pulmonaire, bronchite, la majorité s'avérant après avoir effectué les réactions sérologiques, comme étant des cas de fièvre « Q ».

En effet, l'enquête sérologique initiée en avril 1956, qui a inclu 78% des habitants de la ferme, a prouvé que 38,98% présentaient des réactions sérologiques positives (RFC) vis-à-vis de l'antigène *C. burnetii*, avec des titres allant de 1/8—1/2048, ce qui plaiderait pour un épisode épidémique qui a évolué sur un fond d'endémicité plus ancienne.

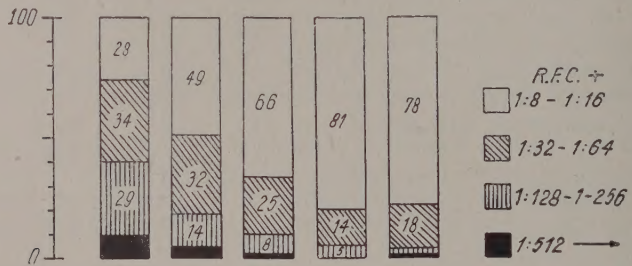
La répartition des réactions sérologiques positives, selon le métier exercé, a montré que dans la plupart des cas il s'agissait des employés du secteur zootechnique (31,53%), suivant par ordre: le secteur mécanique et des transports (28,26%), le secteur administratif (21,74%), le secteur ménager (13,04%) et agricole (5,43%).

L'examen sérologique, répété au mois d'avril de l'année suivante, mais cette fois à tous les habitants de la ferme, a montré la persistance de la fièvre « Q » dans la collectivité; le pourcentage global enregistré a été de 34,45%, donc moindre que celui observé au cours des enquêtes sérologiques de l'année précédente.

La fluctuation du personnel de la ferme et les cas nouveaux enregistrés nous autorisent à parler d'une épidémie traînante de fièvre « Q », entretenue par des cas sporadiques typiques, atypiques ou, parfois, inapparents.

Les enquêtes sérologiques effectuées ultérieurement (novembre 1957, juin 1958) ont montré que le pourcentage des réactions positives s'est maintenu environ au même niveau; à remarquer toutefois, que du point de vue qualitatif on a enregistré des modifications essentielles d'un contrôle à l'autre (pour toute la ferme, ainsi que pour les différents secteurs). Ces modifications sont représentées par une tendance marquée à la hausse des titres bas (1/8—1/16) et la disparition respective des titres élevés, pendant toute la période d'observation.

Ainsi, tandis qu'à la I-ère enquête sérologique (avril 1956) la proportion des RFC positives avec le titre de 1/8—1/16 a été de 28%, au second contrôle



Graphique 1

(avril 1957) elle est montée à 49%, au 3-e contrôle (novembre 1957) à 66%, au 4-e (janvier 1958) — à 81%, pour atteindre au 5-e contrôle (juin 1958) — 78% (graphique 1).

En ce qui concerne les titres élevés on observe une évolution en sens inverse; les chiffres ont montré une incidence plus grande aux 2 premiers contrôles— correspondant aux poussées épidémiques — et une tendance à la diminution qui va jusqu'à leur disparition aux derniers contrôles.

L'analyse des résultats des recherches sérologiques obtenus à la suite des enquêtes en masse, ainsi que les résultats obtenus chez les personnes qui ont présenté différentes affections avec un tableau clinique ressemblant à celui de la fièvre « Q », ont permis la reconstitution de la dynamique des maladies, établissant la possibilité d'une évolution asymptomatique de l'infection.

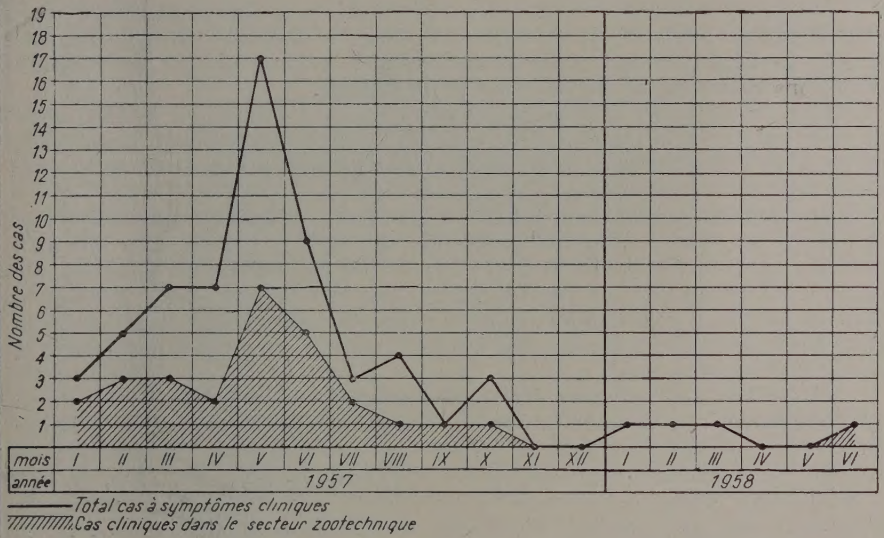
Ainsi, du total des personnes qui ont eu la RFC positive avec l'antigène de *C. burnetii*, seulement 50,4% ont présenté des symptômes cliniques, le reste de 49,6%, ne manifestant aucun trouble.

Bien qu'à ce moment le personnel médico-sanitaire ait été averti de l'existence de la fièvre « Q » dans la ferme, des cas avec symptomatologie clinique, seulement 25,4% ont été suspectés dès le début de fièvre « Q », le reste des cas étant étiquettés initialement comme grippe (29,6%), état grippal (15,88%), congestion pulmonaire (11,11%), etc.

En ce qui concerne la répartition mensuelle de la morbidité des cas cliniquement manifestes, on a établi une courbe d'orientation qui montre l'augmentation progressive de l'incidence de la maladie pendant les premiers mois de l'année, avec un maximum au cours du mois de mai, suivie d'une chute brusque pendant les mois suivants, pour arriver à zéro aux mois de novembre-décembre.

A l'encontre de l'année 1957, en 1958 on n'a enregistré que des cas sporadiques de maladie, dus en grande partie à l'immunisation de la population, qui avait fait la maladie les années précédentes.

Les autres cas, à évolution asymptomatique, décélés seulement à l'aide des examens sérologiques (RFC avec l'antigène *C. burnetii*) n'ont pu être situés en temps et ont été enregistrés en bloc à la date de l'enquête.



Graphique 2

Nous considérons comme particulièrement important de rélever que la répartition par secteurs de travail des cas asymptomatiques montre que le chiffre le plus bas (27,42%) a été enregistré par le secteur zootechnique, qui a présenté en même temps le pourcentage le plus élevé (50%) des cas à évolution clinique typique. La fréquence accrue de ces cas dans le secteur zootechnique, en comparaison avec la fréquence réduite des autres, peut être attribuée aux conditions spéciales de travail (graphique 2).

Une particularité de la morbidité à signaler est le taux élevé de cas (par rapport au nombre de personnes de chaque secteur) observé là, où la fluctuation du personnel a été la plus grande (secteurs zootechnique, ménager, agricole) et le pourcentage plus réduit de cas présenté par les secteurs de travail avec une stabilité plus grande du personnel (mécanique, transports, administratif).

On n'a pas réussi à établir une corrélation entre le temps de résidence à la ferme (la période depuis l'engagement jusqu'au début de la maladie) et le secteur d'activité, l'évolution de la morbidité étant en plus étroite relation avec les moments contaminants auxquels le personnel est incidentellement exposé.

A cause de la diminution du potentiel épidémiologique du foyer et comme suite aux mesures d'éducation sanitaire, combat et prophylaxie, on a observé une diminution progressive des cas de fièvre « Q » parmi les nouveaux engagés pendant la période d'étude de ce foyer.

★

Les données montrent de manière indiscutable que dans cette ferme, pendant la période 1956—1958, a évolué une endémie de fièvre « Q » sur laquelle se sont greffées quelques poussées épidémiques, comme résultat de certaines conditions favorables de transmission de la maladie.

Afin d'élucider les conditions qui ont déterminé l'apparition et l'entretien de cette endémo-épidémie, on a entrepris une série de recherches concernant la présence de l'infection avec la *C. burnetii* chez les animaux de la ferme et ceux du biotope naturel adjacent.

Le premier examen sérologique — avril 1956 — a donné chez les bovines examinées une RFC positive en proportion de 18,48% (56 animaux sur 350) avec des titres oscillant entre 1/8—1/256; les 66 sérums des cabalines ont été négatifs. La répartition par étables montre que la fréquence des RFC positives chez les bovines correspond à l'incidence proportionnelle des réactions positives chez les hommes, atteignant jusqu'à 100% chez le personnel des étables à potentiel enzootique élevé.

Le résultat des enquêtes sérologiques effectuées chez les bovines (environ 1213 examens pendant toute la période d'observation) ont montré une baisse du potentiel enzoo-épizootique, exprimée par une diminution progressive du nombre des animaux sérologiquement positifs: 18,48% en 1956, 4,42% — avril 1957, 4,53% — novembre 1957, 3,58% — juin 1958; le maximum d'incidence des RFC positives a coïncidé avec l'épisode épidémique de fièvre « Q » enregistré chez le personnel de la ferme.

Nos constatations permettent d'affirmer que chez les bovines la RFC avec un titre de 1/8 peut être considérée comme significative, exprimant le contact de l'animal avec l'agent pathogène; les cas à titres élevés (1/64—1/256) représenteraient le résultat d'une infection récente de l'animal.

Nous signalons comme un fait intéressant l'influence de la gestation et des mises-bas sur la dynamique de la RFC chez les vaches. En effet, on a constaté une positivation de la RFC « post partum » chez les animaux antérieurement négatifs du point de vue sérologique, ou une augmentation du titre pendant la période de gestation ou immédiatement « post partum » chez les animaux à titres bas. Ce fait peut être attribué à une réactivation de l'infection, qui agit comme un stimulus antigénique.

On a également constaté la RFC positive, avec un titre relativement accru (1/32—1/128) chez les veaux immédiatement après leur mise-bas, ce qui plaide en faveur de l'hypothèse d'une infection transplacentaire ou celle d'un transfert passif des anticorps maternels.

La RFC executée sur 411 volailles d'espèces variées, 16 chèvres et 11 chiens, appartenant aux employés de la ferme, a donné des résultats négatifs.

Les recherches entreprises sur le biotope naturel des environs de la ferme ont permis la mise en évidence de l'infection comme suit:

— On a isolé une souche de *C. burnetii* d'un hérisson (*Erinaceus europaeus Linné*), avec titre de la RFC de 1/128, capturé aux environs d'une étable, où on avait enregistré des cas de fièvre « Q » (hommes et animaux);

— On a trouvé la RFC positive chez les animaux suivants:

— une pie *(Pica caudata)* sur 3 examinées.

— 9 éperviers *(Buteo buteo)* sur 49 examinés. A remarquer que les poussins d'épervier ont présenté des titres relativement bas (1/8—1/32), tandis que chez les oiseaux adultes les titres élevés ont prédominé (1/256—1/512), fait probablement dû à la possibilité de réinfection, déterminée par la biologie de ces rapaces.

Les autres espèces d'animaux étudiés du point de vue sérologique ont donné des résultats négatifs: 72 rats *(Rattus norvegicus)*, 170 mulots *(Microtus arvalis)*, 27 hamsters *(Cricetus cricetus)*, 7 surmulots *(Crocidura suaveolens)*, 10 chauve-souris *(Myotis myotis)*, 10 musaraignes *(Ondatra zybethica)*, 192 lièvres *(Lepus europaeus)*, 17 renards *(Vulpes vulpes)*, 1 belette *(Mustela nivalis)*, 15 corneilles *(Corvus corvix)*, 4 corneilles des clochers *(Coleus monedula)*, 1 geai *(Garullus glandarius)*, 6 étourneaux *(Turdis vulgaris)*, 6 hibous *(Bubo bubo)*, 2 pigeons *(Columba oenas)*, 6 piverts *(Dryobates maior)* et 21 faisans *(Faseanus colchicus)*.

Les essais de mettre en évidence la présence de la *C. burnetii* chez les tiques appartenant aux genres *Dermacentor*, *Haemaphysalis* et *Ixodes*, sont également restés négatifs.

L'analyse des données mentionnées montre que le réservoir principal de la fièvre « Q » pour l'homme dans l'endémo-épidémie étudiée par nous a été représenté par les animaux domestiques, respectivement les bovines. Selon nos observations, concernant les conditions d'apparition de l'infection avec la *C. burnetii* chez l'homme, l'existence d'un rapport entre les cas de maladies et les bovines à réactions sérologiques positives est nette.

Le graphique 3 représente la corrélation entre l'incidence des maladies humaines, la fréquence des réactions sérologiques positives chez les animaux et la courbe des mises-bas. De son analyse ressort que pendant notre période d'observation on enregistre une diminution nette des animaux sérologiquement positifs, ce qui correspond à une baisse allant jusqu'à zéro des cas humains, bien qu'on observe sur la courbe des mises-bas une évolution relativement constante.

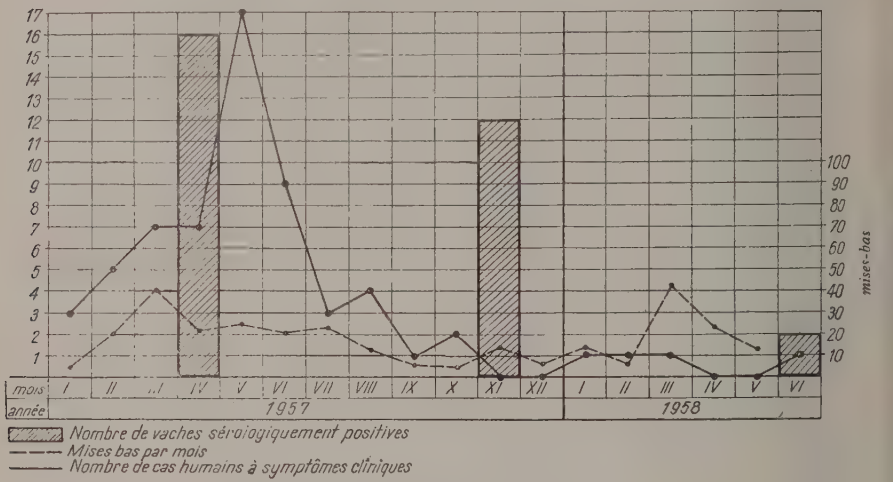
En ce qui concerne l'importance des animaux du biotope naturel en tant que source d'infection pour l'homme et les animaux domestiques, elle paraît être relativement limitée si nous tenons compte de la biologie du hérisson et des oiseaux étudiés.

Vu que le hérisson se nourrit de différents arthropodes, rongeurs ou petits oiseaux, on peut supposer que son infection par la *C. burnetii* constituerait un indice de la présence de cet agent pathogène chez les différents animaux qui lui servent de nourriture ou chez les tiques qui le parasitent, pouvant passer aussi chez d'autres animaux-hôtes. Cette supposition serait également valable en ce qui concerne l'infection des deux espèces d'oiseaux de proie signalées par nous.

En ce qui concerne l'origine de l'infection du hérisson et des oiseaux cités, dans les conditions de nos recherches, nous considérons qu'elle est secondaire

aux infections rencontrées chez les animaux domestiques et chez l'homme. Dans notre cas, ainsi que dans les recherches de RASKA et SYRUCEK en Tchécoslovaquie, le foyer endémo-enzootique a irradié autour de la ferme, passant chez les animaux du biotope naturel et créant, ainsi, dans la nature des foyers secondaires d'infection, pouvant évoluer par la suite de manière indépendante.

En ce qui concerne le mécanisme de la transmission de l'infection, vu le spécifique de la ferme (isolement tbc) et du degré d'éducation sanitaire du personnel, la transmission de la maladie par le lait peut être exclue.



Graphique 3

La voie d'infection la plus probable reste la transmission par voie aérogène, par l'inhalation des rickettsies éliminées dans le milieu ambiant (déjections, placenta et liquides foetaux), ainsi que par le contact du personnel du secteur zootechnique avec les animaux infectés pendant la traite, l'étrillage, le fourrage.

En ce qui concerne la présence de la maladie chez les personnes qui, apparemment, n'ont eu aucun contact avec les animaux (secteur mécanique et administratif), l'infection s'est produite soit à la suite des obligations de service qui leur imposait parfois à entrer dans les étables, soit à la suite du fait que pendant la saison des pluies, pour regagner leur domicile, ils étaient obligés à traverser les étables, où la plus grande morbidité avait été enregistrée.

La contamination du personnel « de ménage » s'est produite selon toutes probabilités par les habits, l'équipement de protection et les chaussures contaminées. On a réussi à établir l'existence d'un rapport direct entre l'infection de deux blanchisseuses et un membre de leur famille et la lessive (blouses des trayeurs et du personnel de service) qui se faisait au domicile des blanchisseuses.

De même, le contact occasionnel avec une « chouba » (longue pelisse fourrée) appartenant à un gardien des étables, a provoqué l'infection de 4 membres du service administratif.

Le taux le plus réduit d'infections, chez le personnel du secteur agricole, s'explique par le fait qu'il travaille au grand air, sans rapports directs avec la source d'infection. Dans ce cas l'infection était due soit au contact direct avec le personnel de la ferme, soit au transport du fumier.

CONCLUSIONS

On relate l'étude d'un foyer de fièvre « Q » dans une ferme zootechnique et agricole, entreprise pendant les années 1956—1958, qui a débuté sous la forme d'une poussée épidémique, par 22 cas d'infections de type respiratoire.

L'examen sérologique initial (RFC) avec l'antigène de *C. burnetii* et l'isolement de l'agent pathogène chez un malade ont confirmé le diagnostic de fièvre « Q ».

Par la même occasion on a établi que des habitants de la ferme 38,98% présentaient des réactions sérologiques positives, réparties comme suit : secteur zootechnique 31,55% ; secteur mécanique et transports 28,26% ; administratif 21,74%, ménager 13,04% et agricole 5,43% (chiffres rapportés aux effectifs de chaque secteur).

La répétition périodique des enquêtes sérologiques, a montré un pourcentage identique de RFC positives pendant toute la durée des observations, avec une tendance marquée à la hausse des titres bas (1/8—1/16) et disparition correspondante des titres hauts.

Des cas sérologiquement positifs, 50,40% ont présenté des symptômes cliniques et le reste de 49,60% une évolution totalement asymptomatique.

Les cas typiques ont été plus fréquents dans le secteur zootechnique.

L'enquête sérologique initiale (RFC avec antigène *C. burnetii*) executée chez les bovines a montré la présence de 56 animaux sérologiquement positifs (18,48%) de l'effectif total, avec diminution du nombre de ces cas aux enquêtes répétées tous les 6 mois, ce qui correspond à la diminution du potentiel enzootique, le maximum de l'incidence des RFC positives chez les animaux coïncidant avec l'épisode de fièvre « Q » humaine.

On a observé la positivation ou la hausse du titre des RFC pendant la gestation et immédiatement après la mise-bas des vaches, ainsi que des titres relativement élevés (1 128) chez les veaux, immédiatement après la parturition.

L'examen sérologique des animaux domestiques (chiens, chèvres, volaille) appartenant au personnel de la ferme, a donné des résultats négatifs.

L'examen sérologique des animaux du biotope naturel a permis de mettre en évidence l'infection chez le hérisson *(Erinaceus europaeus Linné)*, la pie *(Pica caudata)* et l'épervier *(Buteo buteo)*. Les autres animaux examinés (18 espèces différentes), ainsi que 1300 tiques appartenant aux genres *Dermacentor*, *Haemaphysalis* et *Ixodes* ont été négatifs.

La voie de transmission la plus plausible paraît être la voie respiratoire et par contact avec les animaux (déjections, placenta et liquides foetaux).

BIBLIOGRAPHIE

1. Combiesco D. et collab. — Studii și cercet. de inframicrob., microb. și parazitol., 1954, **5**, 229.
2. Combiesco D., Voicoulesco R., Cerbu A., Nicoulesco I., Ionesco-Ioanid Honorina, Faur G., Popesco I., Suciu T., Jivoini T. et Negulesco I. — Travaux Sess. Sc. de l'Institut Cantacuzino, Bucarest, 1955, 155.
3. Combiesco D. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 37.
4. Pavlovski E. N. — O.M.S., Colloque sur la santé publique vétérinaire, Varsovie, 1957, 38.
5. Pavlovski E. N. — Jurnal obscei biologhii, 1947, **7**, 1.
6. Raška K. et Syrucek L. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol. 1956, No. 4, 129.
7. Syrucek L., Sobelavski O. et Havlik O. — Cs. Epid. Mikrob. Immunologie, 1957, **6**, 392.
8. Zarnea G., Alexandresco N., Szegli Lucia, Voicoulesco R., Dincoulesco M., Ionesco Honorina et Perederi S. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie 1959, **18**, 83.
9. Zarnea G., Ionesco Honorina, Voicoulesco R., Szegli Lucia, Alexandresco N. et Perederi S. — Communic. Sess. Sc. de l'Université « C. I. Parhon » — Bucarest.
10. Zdrodovski F. P. et Golinevici M. E. — Ucenie o ricketsiah i ricketsiozah, Medghiz, Moscova 1953, 280.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОЧАГЕ КУ-ЛИХОРАДКИ ПРОТЕКАВШЕГО В СЕЛЬСКО-ЖИВОТНОВОДЧЕСКОЙ ФЕРМЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Сообщаются результаты изучения очага Ку-лихорадки в государственной ферме сельскохозяйственного и животноводческого типа, предпринятого в течении 1956—1958 гг. очаг появился под видом эпидемической вспышки, состоящей из 22 заболеваний респираторного типа.

Проведенное в начале серологическое исследование (РСК) с антигеном *C. burnetii* также как и выделение возбудителя от одного из больных подтвердило диагноз Ку-лихорадки.

Одновременно установлено, что из населения фермы 38,98% имели положительные серологические реакции, распределенные как следует: животноводческая часть 31,53%; механическая и транспортная часть 28,26%; административно-хозяйственная часть 21,74%; домохозяйки 13,04% и сельскохозяйственная часть 5,43% из данных составов

Периодическое повторение серологических исследований показало сохранение почти одинакового процента положительных РСК на все время наблюдений, с выраженным нарастанием числа небольших титров (1/8—1/16) и с соответствующим исчезновением больших титров.

При 50,4% процентов серологически положительных заболеваниях присутствовали признаки болезни, а 49,60% были совершенно безсимптомными.

Типичные случаи встречались чаще всего в животноводческой части.

Серологическое обследование (РСК с антигеном *C. burnetii*) проведенное вначале у коров, выявило наличие 56 серологически положительных животных (18,48%) с последующим уменьшением числа серологически положительных при обследованиях проведенных после шестимесячных интервалов, соответствуя снижению энзоотического потенциала; максимальная частота положительных Р.С.К. у животных соответствовала эпидемической вспышке Ку-лихорадки у людей.

Установлена смена отрицательной РСК на положительную или нарастание титра в течение беременности у коров, как и наличие положительных РСК в относительно высоком титре (1/128) у теленка, тотчас-же после отёла.

Серологическое обследование домашних животных (собак, коз, дворовых птиц) принадлежащих персоналу фермы, дало отрицательный результат.

Расширение исследований применительно к животным из естественной среды вокруг фермы дало возможность выявить инфекцию у ежа (*Erinaceus europaeus L.*) у сороки (*Pica caudata*) и ястреба (*Buteo buteo*)

Остальные дикие животные принадлежащие к 18 разным видам, также как и 1300 клещей принадлежащих к родам *Dermacentor*, *Haemaphysalis* и *Ixodes* дали отрицательные результаты.

Наиболее вероятный путь передачи кажется респираторный и контакт с животными, с их испражнениями, с плацентой и с околоплодными жидкостями.

EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINEN « Q »-FIEBERHERD IN EINEM AGROZOOTECHNISCHEN STAATSGUT

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über die in einem « Q »-Fieberherd in einem landwirtschaftlichen und zootechnischen Staatsgut, während der Jahre 1956—1958 durchgeführten Untersuchungen berichtet. Der erste epidemische Ausbruch umfasste 22 Fälle von Erkrankungen der Atmungsorgane.

Die ersten serologischen Untersuchungen (KBR) vermittels eines Antigens von *C. burnetii* und die Isolierung des Krankheitserregers von einem Patienten bestätigten die « Q »-Fieberdiagnose.

Zugleich konnte nachgewiesen werden, dass von denen auf dem Gut lebenden Personen 38,98% positive serologische Reaktionen aufwiesen, die folgendermassen verteilt waren: zootechnische Abteilung 31,53%; Maschinen- und Transportabteilung 28,26%; Verwaltungs- und Bewirtschaftungsabteilung 21,74%; Hauswirtschaften 13,04%; landwirtschaftliche Abteilung 5,43% (die Prozentsätze beziehen sich auf das Gesamtpersonal der betreffenden Abteilung).

Bei periodischen Widerholungen der serologischen Untersuchung blieben, während der ganzen Beobachtungsdauer, die Prozentsätze positiver KBR ungefähr dieselben, wobei eine ausgeprägte Neigung zur relativen Zunahme der Fälle mit geringen Titern (1/8—1/16) und zum entsprechenden Verschwinden der hohen Titer bestand.

Krankheitssymptome lagen bei 50,40% der serologisch positiven Fälle vor, während 49,60% symptomlos verliefen.

Typische Fälle waren häufiger in der zootechnischen Abteilung anzutreffen.

Die ursprüngliche bei Rindern durchgeführte serologische Untersuchung (KBR mit *C. burnetii*-Antigen) ergab bei 56 Tieren positive Reaktionen (18,48% des Gesamtbestandes). Bei Wiederholungen in Abständen von 6 Monaten, nahm die Zahl der positiven Fälle ab, was dem Absinken des enzootischen Potentials entspricht. Die grösste Häufigkeit positiver KBR bei Tieren fiel mit dem epidemischen « Q »-Fieberausbruch bei Menschen zusammen.

Bei trächtigen Kühen und sofort nach dem Kalben würde eine Positivierung oder ein Titeranstieg der KBR festgestellt. Dergleichen war die KBR bei Kälbern gleich nach der Geburt in verhältnismässige hohen Titern (1/128) positiv.

Serologische Untersuchungen bei den Haustieren (Hunden, Ziegen, Geflügel) des Gutspersonals führten zu negativen Ergebnissen.

Durch Ausdehnung der Untersuchung auf die Tiere des natürlichen, das Gut umgehenden Biotops, konnte die Anwesenheit der Infektion beim Igel *(Erinaceus europaeus L.)*, bei der Elster *(Pica caudata)* und beim Mäusebussard *(Buteo buteo L.)* nachgewiesen werden. Bei anderen wildlebenden Tieren aus 18 verschiedenen Arten sowie bei 1.300 Zecken der Gattungen *Dermacentor*, *Haemaphysalis* und *Ixodes* waren die Ergebnisse negativ.

Am nächstliegenden scheint die Übertragung auf dem Luftwege sowie durch die Berührung mit Tieren, ihren Ausscheidungen, der Plazenta und dem Fruchtwasser zu sein.

EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON A « Q » FEVER FOCUS IN AN AGROTECHNICAL AND ZOOTECHNICAL FARM

SUMMARY

During the years 1956—1958 a study was carried out on a « Q » fever focus in an agrotechnical and zootechnical farm. The first epidemic outbreak comprised 22 cases of disease of a respiratory type.

The « Q » fever diagnosis was confirmed by the serological tests (CFT) with a *C. burnetii* antigen which were carried out shortly after the outbreak and by the isolation of the pathogenic agent from one of the patients.

At the same time, 38.98 per cent from the persons living on the farm were found to display positive serological reactions distributed as follows: zootechnical department 31.53 per cent; department of mechanics and transport 28.26 per cent; administration and managing department 21.74 per cent; household department 13.04 per cent; and agricultural department 5.43 per cent (the percentage rates refer to the total number of persons included by the respective department).

Periodical repetition of the serological investigations showed the percentage rate of positive CFT to stay at about the same level during the whole period of observation, with a marked tendency towards an increased number of low titres (1/8—1/16) and a corresponding disappearance of high ones.

50.40 per cent of the serologically positive cases exhibited signs of disease, while 49.60 per cent were completely asymptomatic.

Typical cases occurred more frequently in the zootechnical department.

Serological investigations (CFT with *C. burnetii*) carried out in cattle revealed the existence of 56 serologically positive animals (18.48 per cent of the entire stock). The number of serologically positive animals decreased at the subsequent examinations practised at 6 months' intervals, *pari passu* with the decrease of the enzootic potentiel. The highest incidence rate of positive CFT in animals coincided with the epidemical « Q » fever episode in humans.

Positivations or titre increases of the CFT were noticed to occur in cows during gestation or immediately after calving. Positive CFT and comparatively high titres (1/128) were recorded in calves immediately after birth.

Serological tests in the domestic animals (dogs, goats, fowls) belonging to the staff of the farm yielded negative results.

Extension of the investigations to include the natural biotope surrounding the farm resulted in the demonstration of the infection in the hedgehog (*Erinaceus europaeus* L.), the magpie (*Pica caudata*), and the buzzard (*Buteo buteo*). In other wild animals belonging to 18 different species as well as 1.300 ticks of the genera *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, and *Ixodes* the results were negative.

The most plausible routes of transmission appear to be the respiratory one as well as contact with the animals, their dejections, the placenta, and the foetal fluids.

LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION EN GEL AVEC DES ANTIGÈNES RICKETTSIENS

par

G. Zarnea, Natalia Mitrică et Honorina Ionesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Rickettsioses et de Physiologie Microbienne)

— Manuscrit reçu le 8 juillet 1960 —

Les réactions de précipitation, si employées en microbiologie et en immunologie, ont été, du point de vue pratique, peu appliquées à l'étude des rickettsies; ce fait est dû aux difficultés présentées par la préparation des antigènes et leur obtention en état relativement pur, ainsi qu'en concentrations qui puissent déterminer une floculation visible. Etant donné que les rickettsies ne se développent qu'en présence de cellules vivantes, les produits antigéniques obtenus contiennent forcément d'importantes quantités de protéines étrangères provenant du tissu infecté, ce qui empêche d'établir avec certitude la présence d'un antigène rickettsien dans la réaction de précipitation.

Malgré ces difficultés, Léon (1942) signale la possibilité d'obtenir des réactions de précipitation des sérums antirickettsiens avec un antigène provenant de l'urine des malades de typhus exanthématique; de même, Topping et coll. (1945) ont utilisé un antigène rickettsien soluble.

En U.R.S.S., Zaiteva a appliqué la réaction de précipitation en anneau pour le diagnostic du typhus exanthématique, utilisant comme antigène une suspension de *R. prowazeki*, obtenue des cultures sur poumon de souris, en concentration de 10 milliards germes/ml, traitée avec du HCl n/10 et ramenée à pH 5,5—6,5. Smadel (1956), en analysant le nombre restreint de résultats obtenus jusqu'à présent par les réactions de précipitation des rickettsies, les considère comme prometteurs, mais souligne la nécessité de recherches supplémentaires dans cette direction.

Dans le présent travail, on a étudié les réactions de précipitation par la méthode de la double diffusion en gel d'agar, entre les antigènes rickettsiens et les antisérums correspondants préparés sur lapin ou récoltés des malades et des convalescents de typhus exanthématique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A cette fin, on a utilisé l'antigène corpusculaire et l'antigène soluble de *R. prowazeki*, cultivées sur le sac vitellin de l'embryon de poulet en cours de développement. La technique de préparation des deux antigènes a été la suivante:

les sacs vitellins, très riches en rickettsies (examen microscopique), ont été triturés (à l'aide du Waringblendor) et émulsionnés en solution chlorurée isotonique (NaCl 0,85%), formolée 4‰. Après traitement par éther éthylique, en parties égales, la phase aqueuse, obtenue après la séparation, à été centrifugée (1 heure à 10.000 t m). Le sédiment des corps rickettsiens — débarrassé par centrifugations et lavages répétés de la plupart des substances étrangères provenant du sac vitellin — a représenté l'antigène corpusculaire (AC); le liquide surnageant — obtenu après la première centrifugation et qui ne contenait plus de rickettsies au contrôle microscopique (coloration GRAÇIAN) — a été utilisé comme antigène soluble (AS); comme témoin on a employé une suspension du sac vitellin normal, obtenue d'un embryon de poulet non-infecté, âgé de 10 jours et préparée dans des conditions similaires (ASN).

Les sérums antirickettsiens ont été préparés sur lapins, par injections intraveineuses répétées (6 10 inoculations). Les animaux ont été contrôlés par le titrage des prélèvements d'épreuve, la saignée finale s'effectuant au moment où les anticorps ont atteint un titre suffisamment élevé.

Les sérums rickettsiens obtenus ont été testés envers l'antigène homologue par la réaction de fixation du complément (RFC), selon la méthode de BENGTSON, ainsi que par la réaction de précipitation en tube UHLENHUTH (RP).

RÉSULTATS

Les résultats obtenus ont été les suivants:

Antigène rickettsien	Antisérum	Titre final du sérum	
		RFC	RP
Antigène corpusculaire de *R. prowazeki*	Sérum anticorpusculaire (SC)	1 : 4096	1 : 500
Antigène soluble de *R. prowazeki*	Sérum antisoluble (SS)	1 : 512	1 : 250
Antigène du sac vitellin normal	Sérum anti-sac normal (SN)	0	1 : 100

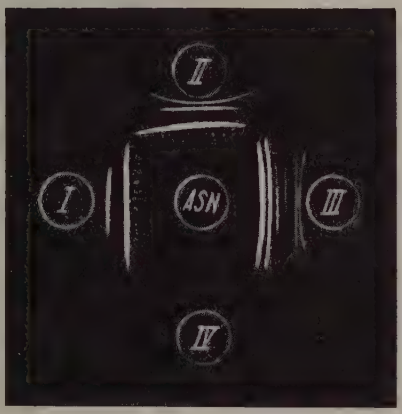
Les réactions de précipitation en gel ont été effectuées selon la méthode d'OUCHTERLONY, qui utilise la gélose 1% avec tampon véronal, pH 8,6, force ionique 0,05. Les résultats des expériences ont été poursuivis pendant 5 jours, à la température du laboratoire, en chambre humide.

Les réactions de précipitation en gel des antigènes mentionnés avec les sérums homologues et hétérologues ont démontré la possibilité d'obtenir des réactions spécifiques, dues aux antigènes solubles et corpusculaires de la *Rickettsia prowazeki*. Dans le cas des corps rickettsiens, les antigènes précipitants sont libérés par la cellule rickettsienne qui, dans les conditions données de travail, souffre un processus d'autolyse.

Les lignes de précipitation données par « le sac vitellin normal » par rapport au sérum antirickettsien ont pu être observées tant chez les antigènes solubles,

a

b



c

Photo 1, a, b et *c.* AC — antigène corpusculaire *R. prowazeki* : AS — antigène soluble; ASN — antigène de sac vitellin normal; I — sérum anti-AC; II — sérum anti-AS; III — sérum anti-ASN; IV — témoin (sérum normal de lapin)

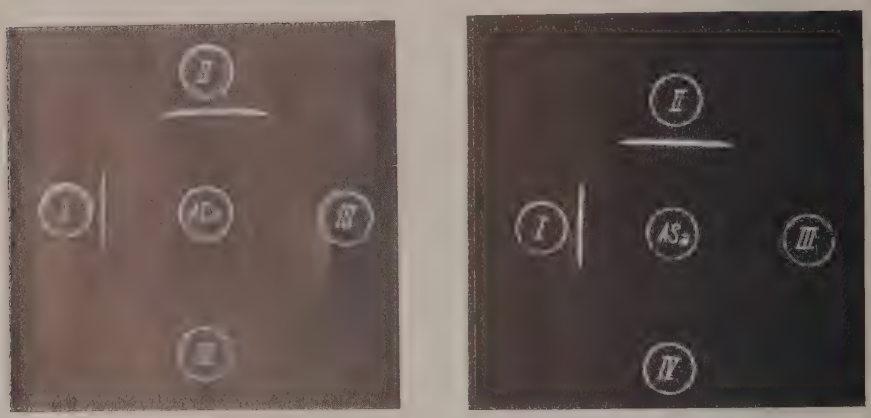
que chez les antigènes rickettsiens corpusculaires, obtenus de cultures du sac vitellin, ce qui prouve qu'ils n'ont pas été complètement débarrassés des protéines étrangères, même lorsque il s'agissait du « soi-disant » antigène corpusculaire purifié. (Photos 1 a, b, c).

Dans le but d'identifier les lignes de précipitation spécifiques dues aux antigènes rickettsiens, on a effectué l'adsorption des deux sérums antirickettsiens avec l'antigène de « sac normal » (ASN).

A cette fin, on a traité 1,5 ml sérum antirickettsien avec 0,4 ml antigène de sac normal. Le mélange a été incubé 3 heures à 37°C et conservé pendant 24 heures au frigidaire (+ 4°C) ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 3000 t/m. Au surnageant on a ajouté 0,1 ml d'antigène, en répétant l'opération indiquée; cette dernière adsorption a été effectuée en vue du contrôle de l'adsorption totale.

Après l'adsorption, les sérums anti ont perdu 50% de leur pouvoir fixateur spécifique, ce qui nous a obligé à effectuer leur concentration envers une solution de polivynile pyrolidon 20%, en sac de cellophane, pendant 72 heures à + 4°. A la suite de cette opération, 2 ml sérum adsorbé ont été concentrés à 0,5 ml.

Les réactions de précipitation en gel, effectuées cette fois avec les sérums adsorbés, ont donné des résultats qui différaient totalement des données obtenues



a b

Photo 2, a et *b*. AC_a — antigène corpusculaire *R. prowazeki* : AS^a — antigène soluble
I — sérum anti-AC adsorbé; II — sérum anti-AS adsorbé; III — sérum anti-ASN adsorbé; IV — témoin (sérum normal de lapin).

avec les sérums bruts. Ainsi, à la suite de l'adsorption, les lignes de précipitation ont été réduites comme nombre et intensité (photos 2 a et b): les sérums anti antigène corpusculaire et anti antigène soluble ne donnent plus qu'une ligne de précipitation, tandis que pour le sérum anti « sac normal », les lignes de précipitation sont complètement disparues, ce qui prouve que la saturation des sérums respectifs avec l'antigene de « sac normal » a éloigné toutes les précipitations non-spécifiques.

Les réactions de précipitation en gel effectuées avec les sérums antirickettsiens non-adsorbés et adsorbés avec l'antigène de « sac normal » ont démontré la présence d'anticorps vis-à-vis du sac normal chez tous les sérums anti préparés sur lapins.

Ce phénomène est dû à la présence de l'antigène respectif dans les préparations employées. On remarque, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, que l'antigène non-spécifique se trouve en plus grande quantité dans l'antigène soluble, que dans l'antigène corpusculaire, qui a été relativement purifié par centrifugations et lavages répétés.

Ces réactions permettent également de conclure que la ligne de précipitation obtenue avec les sérums adsorbés, dans les conditions données, est spécifique aux antigènes rickettsiens.

Afin de vérifier une fois de plus ce résultat, on a procédé à une seconde adsorption du sérum respectif sur un antigène corpusculaire de *R. prowazeki*, obtenu cette fois par culture sur poumon de souris.

On observe que le sérum antirickettsien doublement adsorbé (d'abord avec antigène de sac normal, ensuite avec antigène *R. prowazeki*- poumon de souris) ne donne plus aucune ligne de précipitation (réaction d'OUCHTERLONY) ce qui prouve que la ligne de précipitation est due à un antigène de nature rickettsienne.

On relève le fait qu'on n'a pas réussi à reproduire le phénomène de précipitation en gel avec les sérums conservés et inactivés. Ainsi, les réactions effectuées avec les sérums étudiés, conservés pendant 30 jours au frigidaire (+ 4°) n'ont plus donné de ligne de précipitation; de même les réactions avec les sérums de malades ou convalescents de typhus exanthématique, présentant même un titre de la RFC très élevé (par ex. 1:2048), conservés environ 10 à 14 jours à + 4°C, ont été negatifs. Ces données prouvent que les réactions de précipitation en gel ne sont possibles qu'en présence des sérums antirickettsiens frais et non-inactivés.

Les réactions de précipitation en gel effectuées avec les sérums anti-*Rickettsia prowazeki* n'ont pas donné de réactions croisées avec d'autres antigènes rickettsiens (comme par exemple l'antigène de *C. burnetii*).

Nos recherches ont montré qu'il n'existe aucune corrélation entre la réaction de précipitation en gel et les autres réactions sérologiques, ce qui explique la raison pour laquelle les sérums antirickettsiens positifs avec un titre de la RFC de 1:2048, testés par la réaction de précipitation en gel (OUCHTERLONY), ainsi que la réaction en tube (UHLENHUTH) ont donné des résultats négatifs.

CONCLUSIONS

Nos recherches ont montré que la réaction de précipitation en gel permet la mise en évidence d'un antigène spécifique à la *Rickettsia prowazeki*.

Les expériences ont démontré que l'antigène corpusculaire de même que l'antigène soluble de *R. prowazeki* préparés de cultures d'embryon de poulet en cours de développement, contiennent des antigènes non-spécifiques provenant du sac vitellin. L'existence de ces antigènes a été mise en évidence par les réactions de précipitation en gel, effectuées avec des sérums adsorbés sur un antigène préparé du sac vitellin normal de l'embryon de poulet.

La réaction de précipitation en gel, faite dans ces conditions, avec du sérum adsorbé a montré que de l'ensemble des lignes de précipitation obtenues une seule est due à l'antigène spécifique à la *R. prowazeki*.

La preuve incontestable de ce fait a été obtenue par la répétition de la réaction de précipitation avec des sérums antirickettsiens épuisés, d'abord avec les antigènes de sac vitellin normal, ensuite avec un antigène rickettsien provenant de cultures sur poumon de souris. En effet, l'unique ligne de précipitation — apparue à la suite de la première adsorption — disparaît en présence de l'antisérum doublement adsorbé, ce qui prouve qu'elle est due à un antigène rickettsien.

On a également constaté, au cours de nos recherches, que la réaction de précipitation en gel doit être pratiquée seulement avec des sérums frais et non-inactivés et que ces réactions n'ont aucun rapport avec le titre du sérum obtenu par la réaction de fixation du complément.

BIBLIOGRAPHIE

1. LENNETTE E. H. — in Viral and rickettsial infections of man Rivers T. M., Horsfall F. L. 1959, 238 — 239 Ed. J. B. Lippincoot Company — Philadelphia Montreal.
2. LÉON A. P. — Rev. Inst. salub y enfer. trop. 1942, 3, 201.
3. MESROBEANU L., ZILISTEANU C., MITRICA N., — Med. Internă 1959, I, nr. 1, 153.

4. Smadel J. E. — Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases. 1956, 513, Ed. Aphn.
5. Topping N. H., Bengtson I. A., Henderson R. G., Shepard C. C., Shear M. J. - Nat. Inst. Health Bull. 1945, nr. 183.
6. Zaiteva R. D. dans "Le probleme des récidives du typhus exanthématique" Tocarevici K. Medgiz 1952. Tr. roum.
7. Zarnea G., Dinculescu M. — Metodele serologice de diagnostic în tifosul exantematic Instrucțiuni M.S.P.S. — Sept. 1954.

РЕАКЦИЯ ОСАЖДЕНИЯ В ГЕЛЕ С РИККЕТСИОЗНЫМИ АНТИГЕНАМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из проведенных нами исследований следует, что при помощи реакции осаждения в геле (по Ухтерлони) удалось выявить специфический антиген у риккетсии Провачека.

Опыты дали возможность установить, что как корпускулярный так и растворимый антиген риккетсии Провачека, изготовленые из культур на развивающемся курином эмбрионе, содержат неспецифические антигены происходящие из желточного мешка. Существование данных антигенов выявлено при помощи реакций осаждения в геле, проведенных с сыворотками адсорбированными при помощи антигена приготовленного из нормального желточного мешка куриного эмбриона.

В этих условиях реакция осаждения в геле, проведенная с адсорбированной сывороткой, дала возможность установить, что из всех линий преципитации, полученных с неадсорбированными сыворотками, только одна линия вызвана антигеном специфичным для риккетсии Провачека.

Несомненное доказательство этого положения получено путём повторения реакции преципитации с противориккетсиозными сыворотками, истощенными в первой очереди при помощи антигенов нормального желточного мешка и затем риккетсиозным антигеном происходящим из культур на легких мышей.

В этих условиях единственная линия преципитации появившаяся после первой адсорбции сывороток, исчезла, что показывает, что она вызвана риккетсиозным антигеном.

Опыты показали также, что реакцию осаждения в геле необходимо проводить только со свежими неинактивированными сыворотками, причём эти реакции не имеют никакой связи с титром сыворотки в реакции связывания комплемента.

DIE PRÄZIPITAZIONSREAKTION MIT RICKETTSIENANTIGENEN IN AGARGEL

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergibt sich, dass mit Hilfe der Präzipitationsreaktion in Agargel (Verfahren nach Ouchterlony) ein spezifisches Antigen der *Rickettsia prowazeki* nachgewiesen werden konnte.

Im Verlauf der Versuche wurde festgestellt, dass aus Kulturen von *R. prowazeki* im sich entwickelnden Hühnerembryo gewonnene, korpuskuläre oder lösliche Antigene, aus dem Dottersack stammende unspezifische Antigene enthalten. Die Existenz dieser Antigene wurde durch Präzipitationsreaktionen in Agargel, mit Seren nachgewiesen die vorher mit einem aus dem Dottersack normaler Hühnerembryos hergestellten Antigen adsorbiert worden waren.

Unter diesen Umständen, zeigte die mit dem adsorbierten Serum ausgeführte Präzipitationsreaktion in Agargel, dass von den mit nicht-adsorbiertem Serum erhaltenen Präzipitationslinien nur eine einzige auf ein spezifisches Antigen der *Rickettsia prowazeki* zurückzuführen ist.

Zur absoluten Sicherstellung dieses Sachverhaltes, wurde die Präzipitationsreaktion mit Antirickettsienseren wiederholt, die zunächst mit den Antigenen des normalen Dotter-

sacks und anschliessend mit einem aus Kulturen in Mäuselunge gewonnenen Rickettsienantigen vollständig adsorbiert worden waren.

Unter diesen Umständen verschwand die einzige, nach der ersten Adsorption auftretende Präzipitationslinie, was beweist, dass sie einem Rickettsienantigen zuzuschreiben war.

Im Verlauf der Versuche konnte auch festgestellt werden, dass die Präzipitationsreaktion im Agargel nur mit frischen und nicht-inaktivierten Seren durchgeführt werden muss und dass diese Reaktionen mit dem Titer in der Komplementbindungsreaktion in keinerlei Zusammenhang stehen.

THE PRECIPITATION REACTION IN GEL WITH RICKETTSIAL ANTIGENS

SUMMARY

The investigations performed by the authors showed that a specific antigen characteristic of *Rickettsia prowazeki* could be demonstrated by means of the precipitation reaction in gel (OUCHTERLONY's method).

In the course of the experiments it could be demonstrated that corpuscular as well as soluble antigens prepared from cultures of *R. prowazeki* in developing chick embryos contain nonspecific antigens originating in the yolk sack. The existence of these antigens was demonstrated by means of precipitation reactions in gel with sera which had previously been adsorbed with an antigen prepared from normal yolk sacks of chick embryos.

Under these circumstances, the precipitation reaction in gel with adsorbed sera showed that of all the precipitation lines obtained with unadsorbed sera only one is due to the specific antigen of *Rickettsia prowazeki*.

Peremptory evidence of this fact was obtained by repeating the precipitation reaction versus sera which had been completely adsorbed in a first step with antigens from the normal yolk sack and in a second step with a rickettsial antigen prepared from cultures in mouse lung.

Under these circumstances, the unique precipitation line recorded after the first adsorption of the sera disappeared, which proves that it was due to a rickettsial antigen.

It was also found during the experiments that the precipitation reaction in gel should only be performed with fresh and non-inactivated sera and that these reactions bear no relation whatever to the titre of the sera in the complement fixation test.

RECHERCHES SUR LES ÉLIMINATEURS URINAIRES DANS LA BRUCELLOSE HUMAINE

par

Ofelia Dimitriu, C. Bonciu, Al. Cerbu et Th. Vasilesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Zoonoses)

— Manuscrit reçu le 16 janvier 1960 —

En Roumanie, l'infection brucellique chez l'homme et l'animal est due seulement aux types de *Brucella abortus*, *bovis* et *suis*.

Les formes cliniques les plus fréquentes de brucellose humaine sont les formes chroniques et latentes qui ne se manifestent pas toujours par leur symptomatologie.

Le contrôle séro-allergique périodique a révélé parfois, dans les formes cliniques mentionnées, des phases de décompensation immuno-biologique, les réactions sérologiques devenant positives au moment de l'apparition des phénomènes cliniques.

Par conséquent, nous nous sommes proposé d'étudier dans quelle mesure les sujets contrôlés étaient en même temps éliminateurs de germes par l'urine, vu que les résultats positifs pourraient servir comme prémisses à des recherches épidémiologiques ultérieures concernant la possibilité de transmission de l'infection brucellique de l'homme à l'animal.

Dans ce but, nous avons utilisé l'épreuve biologique, par inoculation de l'urine récoltée chez le cobaye, comptant dépister, à l'aide de ce test, même des bactériuries pauci-microbiennes, vu la grande sensibilité de ces animaux vis-à-vis de cette infection.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

300—500 ml d'urine fraîchement récoltée d'une ou plusieurs émissions de personnes atteintes de brucellose, traités avec du sérum agglutinant antibrucellique (1) ont été centrifugés (1 h. à 3000 t/m); le sédiment entièrement repris en bouillon, est inoculé à 208 cobayes (par groupes de 2 animaux), contrôlés par:

1. Examens sérologiques, effectués à deux reprises (entre le 10-e et 30-e jour après l'inoculation), par les réactions d'agglutination Wright et Renoux et la réaction de fixation du complément.

2. Recherche de l'apparition de l'allergie cutanée (entre le 30-e et 60-e jour après l'inoculation par l'intradermoréaction à la brucelline, 0,1 ml).

3. Examens bactériologiques des animaux sacrifiés, par cultures de tous les organes sur milieu 1. 2. Braun *).

*) Formule du milieu 1. 2. Braun: Peptone Witte — 10 g., chlorure de sodium — 5 g., glucose — 10 g., glycérine — 20 g., agar — 20 g., macéré de viande — 1000 g; pH = 7,0—7,2.

4. Examens histo-pathologiques, pratiqués entre le 45-e et 60-e jour après l'inoculation.

On a contrôlé 104 échantillons d'urine, provenant de 75 personnes avec professions et formes cliniques de maladie différentes (tableau I).

Tableau I

Répartition des personnes examinées par professions et formes cliniques de maladie

Personnes examinées	Profession			Échantillons d'urine	Forme clinique (au moment de la récolte de l'urine)		
	Personnel techn. méd. vét.	Travailleurs zoo-agric.	Sans contact avec les animaux		sous-aiguë	chronique	latente
75	38	35	2	104	9	83	12

Chez 22 des sujets contrôlés, les échantillons d'urine ont été récoltés d'une ou plusieurs émissions à divers intervalles, afin de poursuivre le rythme d'élimination des *brucella*, par rapport aux modifications cliniques et immunobiologiques survenues.

Pour exclure l'hypothèse d'une affection aérogène, on a étudié 6 cobayes normaux témoins, abrités au même endroit que les cobayes inoculés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

De 104 échantillons d'urine inoculés, 19 ont donné des résultats positifs (18,27%) sur 22 de 156 cobayes examinés (52 étant morts de maladies intercurrentes). Les échantillons positifs provenaient de 18 sujets (24% du total des personnes examinées). (tableau annexe A).

1. *Résultats sérologiques*. Quatres cobayes ont donné des résultats sérologiques positifs. Les titres des agglutinines, à l'exception d'un cas (1/1600) étaient bas (1/20—1/40). La réaction de fixation du complément a été positive dans tous les cas.

Chez 3 cobayes, la présence des anticorps spécifiques a été accompagnée de lésions histo-pathologiques caractéristiques.

Le nombre réduit d'animaux possédant des anticorps spécifiques pourrait s'expliquer par l'absence d'une excitation antigénique suffisamment intense. Nos expériences (5) ont montré que surtout dans les infections brucelliques expérimentales avec la souche *Br.ab.*B_{19}, faiblement virulente, ou des souches plus virulentes mais avec un nombre plus réduit de germes, les agglutinines spécifiques apparaissent à un titre bas et disparaissent rapidement de la circulation.

Renoux (9) constate également le manque de réponse sérologique, même chez les cobayes inoculés avec la souche *Br. melitensis*.

2. *L'allergie cutanée*. L'intradermoréaction à la brucelline, de faible intensité, avec érythème cutané et infiltration de 0,5—1,0 cm a été positive chez 3 cobayes. Tous les 3 cobayes présentaient en même temps des lésions brucelliennes caractéristiques.

En ce qui concerne l'intensité de l'allergie cutanée les résultats obtenus concordent avec les données des travaux antérieurs (4) sur la brucellose expérimentale chez le cobaye, selon lesquelles les réactions cutanées sont très faibles ou même absentes dans les infections à germes peu virulents.

3. *Les cultures des organes* ont été négatives, même chez les cobayes avec réactions sérologiques, allergiques et histo-pathologiques positives, ce qui peut s'expliquer, soit par l'infection paucimicrobienne ou la modification des germes dans l'organisme infecté, soit par le fait que les isolements ont été effectués uniquement sur le milieu 1.2. BRAUN, recommandé par BRAUN et BONESTELL (3) pour isoler, identifier et conserver les colonies en forme « S ».

Étant donné que sur ce milieu on n'a obtenu que des cultures d'organes constamment négatives, nous avons entrepris ultérieurement une étude comparative entre divers lots de milieux de culture, ensemencés avec des quantités progressives de germes (souche *Br.* S_6).

Les résultats obtenus étaient discordants selon le milieu employé (gélose simple ou glycérinée-glucosée); nous avons même observé parfois sur le milieu 1.2. BRAUN l'absence totale du développement des *brucella* ensemencées en doses inférieures à 100.000 germes.

Répétant ces expériences comparativement sur milieux avec ou sans glucose et glycérine (tableau annexe B), on a constaté, sur ces derniers, soit une inhibition totale des germes ensemencés avec un inoculum contenant jusqu'a 10^4 germes inclusivement, soit un retard de 7—14 jours dans l'apparition des colonies. Nous soulignons que sur le milieu 1.2. BRAUN, les colonies sont apparues le 5-e et le 7-e jour, en proportion très réduite, même avec un inoculum de 5×10^3.

D'ailleurs, RENOUX constate qu'aucun milieu de culture ne garantit l'isolement des *brucella* de l'organisme infecté.

Ces résultats discordants, rencontrés aussi dans d'autres occasions, lors de l'isolement des germes des produits pathologiques, nous ont déterminés à utiliser, dans le présent travail, la

Tableau II

Résultats histo-pathologiques positifs chez le cobaye (21 des 96 cobayes examinés — 22%)

Répartition des lésions par organes					Lésions											
					1 organe					2 organes (8 cobayes)				3 organes		
ganglions	rate	foie	reins	niveau de l'inoc.	ganglions	rate	foie	reins	niveau de l'inoc.	rate + gangl.	rate + foie	rate + reins	ganglions + niveau de l'inoc.	ganglions + foie + niveau de l'inoc.		
7*)	16	5	1	2	3	9	0	0	0	2	4	1	1	1		

*) de 8 ganglions examinés

méthode biologique, afin de pouvoir contrôler les éventuelles lésions histopathologiques chez les cobayes inoculés.

4. *Résultats anatomo-pathologiques.* Du nombre total des cobayes inoculés avec un échantillon d'urine, seulement 96 ont été soumis à l'examen anatomopathologique, macro et microscopique. Chez 21 d'entre eux on a constaté, dans divers organes, des lésions microscopiques caractéristiques à l'infection brucellique

Les lésions observées peuvent être réparties selon leur aspect:

1. Petits foyers, constitués de cellules épithélioïdes et lymphohistiocytes, parfois avec rares polynucléaires neutrophiles.

2. Granulome caractéristique, formé de cellules épithélioïdes avec nombreux polynucléaires neutrophiles, abcès et infiltration de lymphohistiocytes et polynucléaires, avec ou sans réaction fibroblastique.

La première de ces deux formes a été la plus fréquente (80% des cas). La répartition des lésions dans les organes, ainsi que leur présence concomitante dans plusieurs organes (ganglions, rate, foie, reins) et au niveau de l'inoculation, sont présentées dans le tableau II. Le reste des organes n'a pas révélé de lésions caractéristiques à la brucellose.

Des 22 cobayes positifs, 15 ont présenté exclusivement de lésions histopathologiques, chez 6 autres les lésions étaient associées aux examens séro-allergiques positifs et chez un seul cobaye on n'a trouvé positif que l'examen séro-allergique (Tableau III).

Tableau III

Résultats positifs chez les cobayes examinés en fonction de la méthode utilisée

Total cobayes examinés	Total cobayes positifs	Répartition des résultats selon la méthode utilisée				Résultats obtenus par:					
						1 méthode			2 méthodes		
		Bactériologique	Sérologique	Allergique	Histopathologique	total	histopathol.	séro-log.	total	histopathol. + sérol.	histopathol. + sérol.
156	22	0	4	3	21	16	15	1	6	3	3
	12,5%	0%	2,5%	1,9%	22%						

En ce qui concerne l'épreuve biologique sur cobayes, l'examen histopathologique a donné le plus grand nombre de résultats positifs (22%), prouvant — ainsi que dans l'infection tuberculeuse, — son importance comme méthode courante de diagnostic; les autres méthodes d'investigation sérologique, allergique et bactériologique ont présenté des discordances pour les raisons mentionnées. Ces résultats imposent l'examen histo-pathologique courant des cobayes inoculés avec des produits biologiques suspects.

Contrairement à JAFFE et NOVITZKI (cités par POP et BENEDICT (8)), d'autres auteurs ne sont pas d'accord sur la spécificité du granulome brucellique, ce dernier étant considéré comme une réaction du mésenchyme envers différentes substances excitantes. Toutefois, selon BONCIU et coll. (2), chez 600 cobayes apparemment normaux, examinés dans le laboratoire d'anatomie pathologique, on a

trouvé des lésions ressemblant aux lésions brucelliques (dues à d'autres causes), mais seulement en proportion de 0,67%. Nos résultats montrent que chez les cobayes témoins, non-inoculés, maintenus dans les mêmes conditions, l'examen histologique n'a pas révélé de lésions brucelliques.

Selon nous, les lésions histopathologiques caractéristiques des cobayes inoculés avec l'urine provenant de personnes atteintes de brucellose doivent être considérées comme significatives pour l'infection brucellique.

Tout comme dans l'infection tuberculeuse où le diagnostic est basé uniquement sur l'examen histopathologique (présence de cellules géantes tbc, dans les cas où l'on ne constate point de lésions macroscopiques ou autres signes d'infection tuberculeuse), nous considérons l'examen histopathologique indispensable et concluant pour le diagnostic de la brucellose expérimentale, ainsi que pour les épreuves biologiques avec des produits suspects.

Nos résultats concordent avec les données de RENOUX (9) qui affirme que l'on ne peut certifier l'absence des *brucella* dans le produit inoculé, même lorsque les examens sérologiques et bactériologiques des cobayes sont négatifs. Selon l'interprétation de cet auteur, les éventuels germes étaient trop peu virulents ou bien leur nombre insuffisant pour provoquer la maladie chez le cobaye.

Il faut souligner que l'insuccès de nos organocultures de cobaye, ainsi que des ensemencements de suspensions de diverses densités de *Brucella* S_6 sur milieu BRAUN et autre milieux glucosés glycérolés, prouve que ces milieux peuvent être impropres au développement des brucella, surtout si le nombre de germes est réduit. D'ailleurs, RENOUX (9) a fait la même constatation, en utilisant des milieux considérés optimes pour le développement de ces mêmes microorganismes (milieux *Albimi*).

Par conséquent il résulte que, pour le cobaye comme pour l'homme, la mise en évidence de l'infection brucellique exige un examen de laboratoire complexe (association des examens sérologique, allergique, bactériologique, et histopathologique).

★

Tableau IV

La répartition des éliminateurs d'après les résultats positifs

Total personnes examinées	Personnes positives	Répartition des résultats											Répartition d'après le nombre d'échantillons d'urine récoltés d'une seule personne			
		Profession		l'orme clinique			Examens de laboratoire									
		Pers. techn. méd. vét.	Travailleurs zoo-agric.	Sous-aiguë	Chronique	Latente	Sérologique			Allergique			1	2	3	4
							positif	douteux	négatif	positif	douteux	négatif				
75	18	12	6	5	12	1	15	1	2	15	1	2	9/53	5/17	3/3	1/2
	24%	31,6%	17%	55,65%	14,45%	8,33%							17%	30%	80%	

Les éliminateurs urinaires en rapport avec les formes cliniques

Données sur les éliminateurs humains

No.	Nom	Profession	Forme clinique	Examens		
				Sérologiques		Allergiques
				Aggl.	RFC	
1	M.V.	Méd. vét.	chronique	nég.	nég.	positifs
2	C. Gh.	Trayeur	chronique compensée	1/100	0	négatifs
				1/100	0	»
3	B. Ac.	»	»	posit.	posit.	positifs
4	C. E.	Laborant.	chronique	1/200	+++	»
			récidives	1/200	+++	
			fréquentes	1/200	+++	»
5	V. M.	Trayeur	chronique compensée	1/100	+++	»
6	P. E.	Laborant.	»	1/50	0	»
7	St. Gh.	Trayeur	chronique décompensée	1/200	+++	»
8	M. R.	Méd. vét.	chronique	1/50	+++	»
				1/100	++	»
9	T. M.	Méd. vét.	latente	0	0	»
			latente	0	0	»
			compensée après traitement	1/100	0	»
10	S. M.	Laborant.	subaiguë	1/100	++	»
			»	1/100	++	»
11	E. T.	Méd. vét.	chronique compensée	0	+++	»
			chronique compensée	1/100	—	»
12	V. T.	Méd. vét.	»	1/50	+	»
			subaiguë	1/800	+++	douteux
13	R. I.	Méd. vét.	chronique	1/50	+	nég.
14	St. Gh.	Travail. agric.	chronique compensée	1/100	+++	posit.
15	M. St.	Méd. vét.	chronique compensée	1/100	+++	douteux
16	C. M.	Trayeur	chronique compensée	1/100	+	posit.
			décompensée	1/200	+++	»
17	S. G.	Laborant.	subaiguë	1/200	+++	»
			»	1/200	+++	»
18	G. S.	Méd. vét.	subaiguë	1/200	0	nég.
			chronique	1/100	0	posit.
			»	1/200	0	»
			»	1/200	0	»

Total

Obs.: poumons, coeur, testicules, surrénales, n'ont pas présenté de lésions caractéristiques.

Tableau A

et les résultats des épreuves biologiques sur cobayes

Résultats											
Urine cobayes positifs							Localisation des lésions caractéristiques				
Nombre échantillons urine examinés	Nombre cobayes examinés	Urine positive ou négative	Nombre cobayes positifs	diagnost. par: Sérol.	Allerg.	Histo-pathol.	ganglions	rate	foie	reins	niveau de l'inoculation
1	3	posit.	2	2	0	2	+/+	+/+	0	0	
26/III/957	2	»	1	1	0	0	0	0	0	0	0
5/IV/957	2	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	posit.	1	1	0	1		+	0	0	
17/VII/957	1	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/VII/957	2	posit.	1	0	0	1		+	0	0	
23/VI/958	2	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	posit.	1	0	1	1	+	0	0	0	
1	1	»	1	0	0	1		+	0	0	
1	2	»	1	0	0	1		+	0	0	
6/III/957	1	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28/IX/957	2	posit.	1	0	0	1		+	0	0	
15/III/958	1	»	1	0	0	1	+	0	0	0	
17/VII/958	2	»	1	0	1	1		+	+	0	
15/II/958	1	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7/V/958	1	»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/VI/958	3	posit.	2	0	0	2		+	0	0	
1	1	»	1	0	0	1	0	+/+	+	0	
15/II/958	2	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/III/958	2	»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19/VI/958	2	posit.	1	0	0	1		+	+	0	
1	2	»	1	0	0	1		+	0	0	
1	1	»	1	0	1	1	+	0	0	0	
1	2	»	1	0	0	1	+	0	+	0	+
8/IV/957	1	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24/VII/958	2	posit.	1	0	0	1		+	+	0	
27/VI/958	2	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28/VI/958	2	posit.	2	0	0	2		+/+	0	+	
21/V ,,	2	»	1	0	0	1	+	0	0	0	+
2/VII ,,	1	nég.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7/IX ,,	2	»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9/IX ,,	2	»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32		19 posit.	22	4	3	21	7	16	5	1	2

Tableau B

Tableau comparatif de certains milieux de culture *) utilisés dans l'isolement des Brucella

Nombre germes Br. S_3 ensemencés	Développement des colonies en jours	Nombre colonies					
		Gélose simple			Gélose glycérinée glucosée		
		Peptone Witte	Peptone Martin	„Peptone pepsine" **)	Peptone Witte	Peptone Martin	„Peptone pepsine" **)
50	2	0	0	0	0	0	0
	3	22	0	10	0	0	0
	5	50	48	50	25	0	0
	7	50	48	50	30	0	0
100	2	0	0	0	0	0	0
	3	23	1	6	0	0	0
	5	58	46	91	21	0	0
	7	58	46	91	54	0	0
500	2	0	0	0	0	0	0
	3	300	3	20	0	0	0
	5	475	498	500	115	0	0
	7	475	498	500	153	0	14
1.000	2	0	0	0	0	0	0
	3	650	5	36	0	0	0
	5	825	800	950	300	0	0
	7	825	800	950	320	0	18
5.000	2	0	0	0	0	0	0
	3	+ + +	+ +	+ +	0	0	0
	5	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	0	0
	7	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0	72
10.000	2	+ + +	0	0	0	0	0
	3	+ + +	+ + +	+ + +	0	0	0
	5	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	0	0
	7	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + +	0	188
100.000	2	+ + + +	0	0	0	0	0
	3	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0	0	0
	5	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0	100
	7	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0	+ + + +

*) Milieux pH = 7, préparés avec les mêmes macérés + +, + · , · · · · = développement en nappe
**) Peptone Martin avec pepsine en poudre (Å Merx 1957)

Il ressort de nos observations, que dans les formes cliniques latentes et chroniques de brucellose l'intensité de l'élimination des germes est faible, même lorsqu'elle est appréciée par l'épreuve biologique. En effet, nous n'avons réussi à mettre en évidence l'infection brucellique chez le cobaye que par une ou deux des 5 méthodes de diagnostic, utilisées à la fois, faits constatés également dans les infections expérimentales avec des germes faiblement virulents. L'élimination pauci-microbienne a été prouvée aussi par le fait que dans la majorité des cas un seul des deux cobayes inoculés avec le même échantillon d'urine a donné des résultats positifs.

Le caractère intermittent de l'élimination des *brucella* par l'urine explique la raison pour laquelle le contrôle de plusieurs échantillons d'urine, récoltés à divers intervalles, n'a pas donné de résultats positifs chez tous les éliminateurs (19 de 32 — tableau annexe A) ce qui impose l'examen de plusieurs échantillons d'urine (tableau IV).

Les épreuves biologiques répétées à divers intervalles, chez la même personne, offrent la possibilité de dépister les éliminateurs de germes pendant les différentes phases de la maladie. Ainsi, dans 4 cas étudiés de cette manière, on a constaté l'élimination de germes seulement pendant les périodes de décompensation clinique (cas Nos. 10, 12, 16, 18 — tableau annexe A).

Soulignons toutefois que nous avons constaté l'existence d'éliminateurs de germes par l'urine à l'aide du test biologique sur cobayes aussi dans des cas de brucelloses chroniques compensées, avec troubles cliniques minimes. L'élimination de germes dans les formes asymptomatiques a été signalée par divers auteurs: Versilova, Shew, Fringeld, Vorobieva — cités par Drobinski (6), pouvant se prolonger parfois longtemps après la guérison clinique (Pervusin, Kalina, Miasnikov, Durem — cités également par Drobinski (6)).

Rapportant les résultats positifs par profession, nous avons observé que le nombre des éliminateurs est plus élevé parmi les médecins et les techniciens vétérinaires — 12 de 38 (31,6%), que parmi les travailleurs agricoles — 6 de 35 (17%). Cette différence de pourcentage peut s'expliquer par le fait que le personnel technique venant en contact avec des quantités massives de germes est plus exposé à faire des formes cliniques évolutives.

D'après la littérature de spécialité, l'elimination des *brucella* a surtout lieu dans la brucellose déterminée par le type *melitensis* (Wainwright cité par Grinfeld (7)).

De nos recherches il résulte que dans la brucellose due aux types *abortus* et *suis*, à formes cliniques chroniques et latentes, prédominantes en Roumanie, les éliminateurs de germes existent en proportion de 24%, ce qui peut s'expliquer soit par la localisation rénale de l'infection, soit par des bactériuries intermittentes.

Ces résultats soulèvent le problème épidémiologique de l'importance de ces éliminateurs humains dans la transmission de l'infection à l'homme et surtout aux animaux indemnes. Drobinski (6) attire également l'attention sur l'importance des porteurs humains de *brucella*, opinion partagée aussi par d'autres auteurs soviétiques (Uvarova, Lomaskin, Birik).

Zdrodovski (10) affirme (basé sur les résultats bactériologiques négatifs qu'il a obtenus, qui concordent d'ailleurs avec nos observations) que l'on ne peut nier le danger que représentent les malades et les porteurs humains pour les animaux indemnes.

L'existence des éliminateurs humains de germes par l'urine impose un contrôle sérologique périodique préventif, en même temps que des examens bactériologiques par le test biologique sur cobaye, ainsi qu'une répartition judicieuse du travail du personnel infecté dans les élevages d'animaux.

CONCLUSIONS

1. Dans les infections humaines avec *Br. abortus* et *Br. suis*, nous avons constaté, à l'aide de la méthode biologique sur cobayes, un pourcentage de 24% éliminateurs de germes par l'urine.

2. De tous les tests effectués sur cobayes (sérologique, allergique, bactériologique et anatomo-pathologique), le test histopathologique a donné les résultats positifs les plus fréquents.

3. L'élimination des germes par l'urine a un caractère intermittent et pauci-microbien. Par rapport aux formes cliniques de brucellose, les éliminateurs urinaires sont plus nombreux dans les formes subaiguës (55,65%), moins dans les formes chroniques (14,45%) et peu nombreux dans les formes latentes asymptomatiques (8,44%).

BIBLIOGRAPHIE

1. Amoss, Poston — J.A.M.A., 1929, **93,** 170.
2. Bonciu C., Dimitriu O., Cerbu A. et Vasilesco T. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19,** 221.
3. Braun W. et Bonestell A.E. — Am. J. Vet. Res., 1947, **29,** 386.
4. Dimitriu O., Cerbu A. et Vasilesco T. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 447.
5. Dimitriu O., Vasilesco T. et Cerbu A. — Arch. Roum. de Path .exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 227.
6. Drobinski I.R. — Porteurs de microbes — Moscou, Ed. Roum., 1955, 293, 375, **483.**
7. Grinfeld A. et Neumann M. V. — Zbl. f. Bakt., 1941, **140,** 341.
8. Pop A. et Benedidct I. — Bruceloza umană — Bucureşti, Ed. Med., 1954.
9. Renoux G. — Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 1958, **35,** 199.
10. Zdrodovski I.P. — La Brucellose — Moscou, Medghiz, 1948.

НАБЛЮДЕНИЯ НАД МОЧЕВЫМИ ВЫДЕЛИТЕЛЯМИ ПРИ БРУЦЕЛЛЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В настоящей работе пытались установить в какой степени больные бруцеллёзом являются в то же время мочевыми выделителями; исследования проводились при помощи биологического испытания на морских свинках, имея в виду высокую чувствительность этих животных к бруцеллёзной инфекции; получены следующие результаты:

— при заболеваниях человека, вызванных *Br. abortus, Br. suis* установлено при помощи биологического испытания на морских свинках, наличие 24% мочевых выделителей.

— Среди испытаний проведенных на морских свинках (серологических, аллергических, бактериологических и анатомо-патологических) гистопатологическое обследование дало (также, как и при туберкулёзе) наиболее частые положительные результаты.

Таким образом для диагностики бруцеллёзной инфекции у морских свинок, зараженных подозрительным на бруцеллёз материалом, необходимо всегда серо-аллергические обследования сопровождать гистопатологическими исследованиями.

При бруцеллёзе человека, вызванным *Br. abortus*, *Br. suis* выделение микробов в моче имеет прерывистый характер и содержит скудное количество микробов.

В зависимости от клинических форм бруцеллёза, частота мочевых выделителей, распознаваемых при помощи вышеуказанных тестов равнялась 55,65% при подострых формах, 14,45% при хронических и 8,33% при латентных асимптоматических формах.

Полученные результаты ставят вопрос эпидемиологического значения людей — носителей для передачи инфекции людям и в особенности здоровым животным.

UNTERSUCHUNGEN UBER DIE AUSSCHEIDUNG VON KEIMEN IM HARN BEI DER BRUZELLOSE DES MENSCHEN

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ausmass der Keimausscheidung im Harn bei an Bruzellose leidenden Kranken untersucht. Angesichts der grossen Empfindlichkeit von Meerschweinchen für die Bruzelleninfektion, wurde bei dieser Untersuchung die biologische Probe am Meerschweinchen verwendet. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

— Bei menschlichen Infektionen mit *Br. abortus* und *Br. suis* liess sich vermittels der biologischen Methode am Meerschweinchen in 24% der Fälle die Ausscheidung von Keimen im Harn feststellen.

— Von den an den Meerschweinchen durchgeführten (serologischen, allergischen, bakteriologischen und histopathologischen) Untersuchungen, ergaben die histologischen (ebenso wie bei der Tuberkulose) am häufigsten positive Befunde.

Für die Diagnose der Bruzelleninfektion bei mit verdächtigem Material geimpften Meerschweinchen müssen demnach, ausser den serologischen und allergischen Proben, immer auch histopathologische Untersuchungen durchgeführt werden.

Bei der durch *Br. abortus* oder *Br. suis* hervorgerufenen menschlichen Bruzellose, werden Keime im Harn immer nur in geringer Anzahl und intermittierend ausgeschieden. Im Zusammenhang mit den klinischen Formen der Bruzellose, war die Häufigkeit der durch die angegebenen Untersuchungsmethoden aufgedeckten Keimausscheider wie folgt: 55,65% bei subakuten Erkrankungen, 14,45% bei chronischen Formen und 8,33% bei latenten, symptomlosen Formen.

Diese Ergebnisse werfen die Frage nach der epidemiologischen Bedeutung der menschlichen Keimausscheider bei der Übertragung der Infektion auf gesunde Personen und insbesondere auf Tiere auf.

INVESTIGATION ON URINARY ELIMINATORS IN HUMAN BRUCELLOSIS

SUMMARY

In the present work it has been investigated to what extent patients suffering from human brucellosis eliminate the germs in the urine. Because of the great susceptibility of guinea-pigs to brucella infections, the investigations were carried out by means of the biological test in the guinea-pig. The following results were obtained:

— In human infections with *Br. abortus* or *Br. suis* the incidence rate of urinary eliminators was found by means of the biological test in the guinea-pig to be 24 per cent.

— Of the tests performed in guinea-pigs (serological, allergic, bacteriological and histopathological), histopathological examinations yielded the highest number of positive results (just as in tuberculosis).

Hence, for the diagnosis of brucella infection in guinea-pigs inoculated with suspect material, histopathological examination should always be associated with the serological and allergy tests.

In human brucellosis due to *Br. abortus* and *Br. suis* urinary elimination of the germs has an intermittent character and the number of organisms is small. In relation to the clinical forms of brucellosis, the incidence of urinary eliminators as demonstrated by the above tests was of 55.65 per cent in subacute forms, 14.45 per cent in chronic forms, and 8.33 per cent in latent, assymptomatic forms.

These results raise the epidemiological problem of the importance of human carriers in the transmission of the infection to humans and in particular to healthy animals.

COMPARATIVE STUDY ON DIFFERENT STRAINS OF *L. BIFLEXA* AS ANTIGEN FOR THE COMPLEMENT FIXATION TEST IN LEPTOSPIROSIS

by

NINA STURDZA and M. ELIAN

(from the « Dr. I. Cantacuzino » Institute — Division of Leptospiroses)

— Received for publication, June 13 1960 —

In a preliminary paper (12) was shown that a concentrated merthiolated antigen prepared with the *L. biflexa* Patoc strain is capable of fixing the complement in presence of the serum obtained from cases of leptospirosis. The same sera in the agglutination lysis test (ALT) yielded significant titres for the following serotypes: *L. pomona*, *L. sejroe*, *L. hebdomadis*, *L. hyos (tarassovi)* (13), *L. bataviae*, *L. icterohaemorragiae*, *L. grippotyphosa*, and *L. canicola*.

In 79 cases studied serologically during the evolution and recovery of the disease, the fixing and agglutinating titres progressed, the complement fixing test (CFT) occurring sometimes earlier than the ALT. In 100 per cent of cases results proved positive in both reactions between the 3rd and 4th week from onset, the CFT begining to negativate before the ALT after the 6th week.

One hundred and thirty-six serological tests obtained from individuals presenting other diseases, remained negative to each of the two tests.

The sensitivity of *L. biflexa* Patoc was observed in the ALT (6), this strain being frequently coagglutinated by sera collected from cases of leptospirosis. Paradoxical reactions with *L. biflexa* Patoc have been also observed by KMETY (10) in Czechoslovakia.

The use of a non-pathogenic strain, with an abundant and rapid growth, as antigen with a polyvalent value is advantageous for allowing an easy means of preparing the antigen as well as the introduction of a new method available to every laboratory in the diagnosis of leptospirosis.

The antigen sensitizing sheep erythrocytes, as obtained by COX (8) from *L. biflexa*, although very sensitive since it allows the diagnosis of leptospirosis, irrespective of the serotype, is not very simple to prepare. Moreover, the necessity of a preliminary absorption of human serum with sheep erythrocytes renders this reaction more laborious than a complement fixing reaction with a single antigen.

The role of *L. biflexa* as antigen for the detection of leptospiroses can be explained by the existence of a common-genus antigen or of a high antigenic complexity which cannot be cleared up except by fine chemical analyses.

The present study was undertaken to compare by the CFT five antigens prepared with five different strains of leptospira (4 saprophytic strains and

a pathogenic one) in order to see if the reactivity of *L. biflexa* Patoc is common to the *leptospira biflexa* or if it is a peculiarity of this strain.

The five antigens were used in the CFT against 32 immune sera prepared on rabbits, and against 100 human sera.

MATERIAL AND METHODS

Antigens. For the preparation of the antigens in the CFT were used the following strains of leptospira *)

L. biflexa Patoc (Babudieri)
L. biflexa madida (Terskih-Petrovskaia-Fokin)
L. biflexa Peschiera (Babudieri)
L. biflexa Ancona-Porto (Babudieri)
L. semarang (Sardjito-Mochtar)

Of these five strains, two are antigenically close related to *L. biflexa* Patoc (according to the cross absorption reactions) (5,7): *L. biflexa* madida (subtilospira) isolated by TERSKIH and PETROVSKAIA-FCKIN in 1931 in the region of Moscow, and *L. semarang* (group Wolff XVIII) isolated by SARDJITO and MOCHTAR in 1939 from *R. brevicaudatus* in Java. The other two strains of *L. biflexa*, reckoning by the cross-agglutination-lysis tests, are antigenically independent.

Besides these five strains were used as well the serotypes *L. pomona* and *L. hyos* for the preparation of small quantities of antigen with which a limited number of sera were controled by the CFT.

The antigens were prepared from 8 to 10 day-old-cultures on Korthof medium (incubation at 28°C) merthiolated 1/10.000 and centrifuged one and a half hour at 4000 rpm; the deposit was retaken in 1 20 of its initial volume in a saline solution 0,85%, merthiolated 1 10.000. After careful homogeneisation and storage at 4°C for 5 to 7 days, each antigen was titrated for the anti-complementary power as well as against the homologous immune and normal sera. The specific titre of the obtained antigen oscillated from 1/32 to 1/512, whilst the anti-complementary titre or the titre for normal serum was at maximum 1 4. The antigens with a specific fixation titre high enough to allow their safe employment in the reaction of 4 fixing units were taken into consideration.

For the ALT the following 12 serotypes were used (supplied in 1956 by Prof. Wolff).

L. icterohaemorrhagiae Wijnberg AB
L. javanica-poi
L. canicola H. Utrecht
L. ballum M 127
L. autumnalis Akiyami AB
L. australis A Ballico
L. pomona
L. grippotyphosa Bernkopf
L. hebdomadis
L. sejroe M 84
L. bataviae Swart V. Tienen
L. hyos (mitis Johnson)

Sera. The antigen were controled in the CFT with: 28 immune rabbit sera corresponding to 28 pathogenic serotypes (Table I), and 4 homologous anti-biflexa

*) *L. biflexa* Patoc, Peschiera and Ancona-Porto were obtained in 1957 from Prof. B. Babudieri, Ist. Sup. di Sanit, Rome.
L. madida received in 1956 from Prof. Terskih — Moscow, Gamaleia Institute, *L. semarang* obtained from Prof. Wolff in 1956 — Inst. Trop. Hyg. Amsterdam.

Table 1

Behaviour of 32 antileptospiral sera (prepared on rabbits) in the complement fixing test with different antigens

	antileptospiral sera	Homologous agglut. titre	Complement fixing test for the following antigens						
			Patoc	Madida	Pes-chiera	Ancona-Porto	Sema rang	Pomona	Hyos
1	*icterohaemor.* AB WIJ.	1/12800	1/4	0	1/4	0	0	1 8	1/8
2	*icterohaemor.* A.K..	1/8000	1/4	0	1/4	0	0	—	—
3	*mankarso*	1/12800	1/8	0	1/4	0	0	0	—
4	*naami.*	1/4000	1/6	0	0	0	0	—	—
5	*sarmini.*	1/16000	1/8	1/8	1/32	1/8	0	—	—
6	*schuffneri*	1/2000	1/32	0	1/64	1/8	0	—	—
7	*canicola.*	1/12800	1/64	1/8	1/64	1/16	1/8	—	—
8	*benjamini*	1/4000	1/32	1/16	1/64	1/16	1/16	—	—
9	*ballum.*	1/8000	1/32	1/32	1/32	0	1/16	—	—
10	*pyrogenes*	1/4000	1/4	0	1/4	0	0	—	—
11	*australis* B.	1/4000	1/4	0	1/4	0	0	0	—
12	*cynopteri*	1/6400	1/8	0	1/8	0	0	0	—
13	*sentoti*	1/2000	1/8	0	1/32	1/8	0	—	—
14	*autumnalis* AB.	1/8000	1/128	0	1/64	0	0	—	—
15	*autumnalis Rachmat*	1/16000	1/32	1/8	1/32	1/8	1/8	—	—
16	*djasimani*	1/16000	1/16	0	1/32	1/8	0	—	—
17	*australis* A *Ball.*	1/8000	1/256	1/32	1/64	0	1/32	—	—
18	*pomona*	1/4000	1/64	1/32	1/128	1/32	1/8	1/128	1/16
19	*grippotyph. Bernk*	1/8000	1/16	0	1/32	0	0	—	—
20	*hebdomadis*	1/8000	1/32	1/8	1/64	1/16	0	—	—
21	*medanensis*	1/6400	1/32	0	1/128	1/32	0	0	—
22	*wolffi*	1/2000	1/32	0	0	0	0	—	—
23	*sejroe*	1/3200	1/64	1/16	1/64	0	0	—	—
24	*saxkoebing*	1/25600	1/128	0	1/64	1/8	0	0	—
25	*bataviae* SW. *v.* T.	1/8000	1/64	1/32	1/32	1/32	1/8	—	—
26	*semarang*	1/8000	1/256	1/128	1/8	0	1/128	0	1/4
27	*andaman* A CH 11	1/4000	1/64	1/32	1/64	1/32	1/16	0	1/4
28	*hyos (Mitis J)*	1/8000	1/32	0	1/16	0	0	1/8	1/128
29	*biflexa Patoc*	1/2000	1/512	1/64	1/32	0	1/64	1/8	1/16
30	*biflexa Madida*	1/16000	1/512	1/512	1/64	1/8	1/512	1/8	1/16
31	*biflexa Peschiera*	1/8000	1/8	0	1/512	1/8	0	0	1/4
32	*biflexa Ancono-Porto*	1/4000	1/8	0	1/16	1/256	0	0	0
1	Control normal rabbit 1	—	0	0	0	0	0	—	—
2	Control normal rabbit 2	—	0	0	0	0	0	—	—
3	anti-Salmonella para-C serum	—	0	0	0	0	0	—	—

sera prepared with the strains used as antigens. As controls, two normal rabbit sera and an anti-*Salmonella paratyphi C* were used.

Of the immune type sera, only the anti-biflexa: Patoc, Peschiera, Ancona-Porto and anti-*icterohaemorrhagiae* W, anti-*cynopteri*, anti-*mankarso*, anti-*saxkoebing*, anti-*australis* B, and anti-*djasimani* were prepared in 1960. The others have been stored at + 4°C in vials since 1956—1958.

Apart from the immune rabbit sera, 100 additional tests of human sera have been examined:

1. Thirty samples with a positive ALT, of which 28 from patients infected in the summer of 1959. The choice of these sera depended on the quantity left after the investigations made in 1959, relatively to the diagnostic value of *L. biflexa* Patoc in the CFT.

2. Seventy samples of human sera with a negative ALT comprizing 58 cases with no precise diagnosis, 7 cases of epidemic hepatitis, and 5 with an intensely positive BORDET-WASSERMANN reaction.

METHODS

The immune sera have been retitrated by the ALT against the homologous strain, and the human sera were controled by the ALT against the 12 leptospiral types used in the laboratory for routine diagnosis.

All the sera were further titrated by the CFT against the 5 mentioned antigens. The technique used was the one recommended by I. BENGTSON (3) which has the advantage of economizing both antigen and serum.

Twofold dilutions of serum were used, starting with the dilution 1/4 to which 4 units of antigen and 2 units of complement were added. Readings were effectuated one hour after addition of the hemolytic system (incubation at 37°C) and after 18 hours at room temperature.

The dilutions of serum in which the complement fixation was minimum (+++) were considered positive.

RESULTS

A. *Immune type sera.* Table I shows the results obtained with the 32 rabbits immunized with leptospira, and the 3 control sera.

It is apparent from this table that 24 out of 28 patogenic serotypes produce in rabbits fixing antibodies for one or several of the used antigens.

The frequency with which each of these antigens reacts, can be totalised as follows (considering but the minimal titre 1/8).

24	sera	(85,75)	fix the complement in	presence of	biflexa Patoc	antigen	(titres: 1/8 to 1/256)
21	»	(75%)	»	»	»	»	»	Peschiera	antigen	(titres: 1/8 to 1/128)
13	»	(46,82%)	»	»	»	»	»	Ancona	»	(titres: 1/8 to 1/32)
11	»	(39,28%)	»	»	»	»	»	Madida	»	(titres: 1/8 to 1/128)
8	»	(27,50%)	»	»	»	»	»	L. semarang	»	(titres: 1/8 to 1/32)

The 3 control rabbits reacted to none of the 5 antigens, neither did the anti-*icterohaemorrhagiae* AB and A sera, nor the anti-*australis* A and the *pyrogenes* sera.

Six of the immune type sera responded to all the 5 antigens: anti-*canicola*, anti-*benjamini*, anti-*autumnalis* Rachmat, anti-*pomona*, anti-*bataviae* Swart, and anti-*andaman* A CH 11.

The fact that in the majority of cases a single immune serum of the same type was used — showing the mode of reaction of a rabbit — causes the results obtained to have a preliminary informative value. A differing individual response in rabbits, immunized with the same serotype, is not excluded. On the other hand, the immune sera stored over one year at + 4°C, lose part of the agglutinins and fixing antibodies.

It is nevertheless apparent, that the majority of the controled immune sera (irrespective of the serotype) fix the complement in presence of the biflexa Patoc antigen, and despite the antigenic relationships existing between *L. biflexa* Patoc, *L.* madida, and *L. semarang*, (disclosed also by the cross complement fixing test) the latter two antigens possess a much more restricted complement fixing capacity than *L. biflexa* Patoc. *L. biflexa* Peschiera, though antigenically different, has an almost similar action to that of biflexa Patoc on immune sera.

B. *Human sera.* From 100 human sera controled comparatively by ALT against 12 types of leptospira, and by CFT against 5 different antigens, 29 responded positively, and 67 negatively to each of the two tests (ALT and CFT). Table II). Thus the reactions concorded in 96 per cent of the sera *).

Discordances were noted in 4 cases, and namely: 3 sera with a positive CFT (1/8—1/64 for the *L. biflexa* Patoc antigen) were negative to the ALT, and an ALT positive serum (1/400, *L. grippotyphosa* and *L. autumnalis*) remained negative to the CFT with all the 5 antigens.

Nineteen of 32 cases with a positive CFT were confirmed on successive examinations by an increase of the titre.

Two of the sera with a positive CFT and a negative ALT belonged to cases which ulteriorly became positive for the ALT (*L. pomona* 1/600; *L. hyos* 1/6400). The third with a positive CFT (1/64 with *L. biflexa* Patoc, and 1/32 with *L. biflexa* madida), and a negative ALT for the 12 experimental serotypes was submitted to the agglutination-lysis test with 17 other serotypes and yielded the following results:

L. sentoti 1/800
L. semarang
L. naami } 1/200
L. andaman A CH 11

Totalizing results obtained with serologically positive human sera (Table II) a different aspect stands out from that obtained with immune sera prepared on rabbits.

*) This incidence rate decreases to 95,04% if a recent case is added which must be reckonned as a proven case (with a negative ALT on the 6th day, is positive on the 15th day for *L. hyos* 1/6400); controled with *L. biflexa* Patoc antigen alone, remained negative to the complement fixing test.

As seen in Table II, out of the 30 sera with a positive ALT:

10 had a maximum titre for *L. pomona*
10 » » » » » *L. sejroe*
2 » » » » » *L. hyos*
1 » » » » » *L. icterohaemorrhagiae*
1 » » » » » *L. bataviae*
1 » » » » » *L. grippotyphosa*
1 » » » » » *L. poi*
4 agglutinated 2 different serotypes at the same titre

29 of these sera yielded a positive CFT with *L. Biflexa* Patoc antigen at titres ranging from 1/16 to 1/1024, (96,66 %).

18	sera	(60%)	fixed	the	complement	(1/4—1/512)	also	with	the	madida antigen
15	»	(50%)	»	»	»	(1/4—128)	»	»	»	semarang »
10	»	(33,33%)	»	»	»	(1/4—132)	»	»	»	Peschiera »
2	»	(6,66%)	»	»	»	(1/8)	»	»	»	Ancona »

Comparing results obtained from immune sera of rabbits with human positive ones, it appears that only the reactivity of the Patoc antigen predominates in both categories of sera, while the order of sensitivity of the other antigens seems to differ.

For the immune rabbit sera, after the Patoc antigen, — the most reactive (against 85,71% of the tested serotypes) — follows the Peschiera antigen (reacting with 75% of the serotypes), the Semarang antigen having the weakest polyvalence (27,5%).

The human sera with a positive ALT react in the majority of cases by the fixation of the complement in presence of the Patoc antigen, after which follow in decreasing order the antigens: madida, semarang, Peschiera and Ancona.

In spite of the apparently close relationship of *L. biflexa* Patoc, *L.* madida and *L. semarang* judging by the agglutination and cross absorption, and the cross-fixing reactions, these strains behave differently toward the heterologous sera, this difference being more marked in the immune rabbit type sera.

In any case the *L. biflexa* Patoc strain in comparison with the 4 other strains seems to have the most polyvalent antigenic value.

It is noteworthy that although the immune anti-icterohaemorrhagiae type sera do not react in presence of biflexa Patoc antigen, the human sera with a maximum agglutinating titre for the same serotype, are showing high CFT titres in presence of this antigen (6).

The majority of the positive human sera have been examined by the ALT and CFT (only for the *L. biflexa* Patoc antigen) also in the summer of 1959. In 5 of the sera, the fixing titre decreased with 2-3 dilutions (1/4096 in 1959, and 1/1024 at the retitration in 1960) after storage of 7 to 11 months at + 4°C. Such lowerings of titres have also been observed in the agglutination-lysis test. Many of the positive CFT sera showed concomitently hemagglutination on the first dilutions. Agglutination of sheep erythrocytes is likewise observed in some of the non-leptospiral human sera, if the hemagglutination reaction is performed.

Zone phenomenon: hemolysis in the first 2 tubes (1/4 — 1/8) followed by complete fixation in the next dilutions, was observed as well in some of the highly positive sera.

Complement-fixing-test against different antigens in 30 human sera with a positive agglutination-lysis-test

	Number of serum	Day of disease	ALT results		CFT results						Observations		
			Agglutinins	Coagglutinins	Fixing titre against different antigens						Serological results obtained at other intervals from onset of disease		
					L. biflexa				*L. semarang*	*L. pomona*	day of disease	ALT	CFT (L. Patoc)
			Leptospira	Leptospira	*Patoc*	*Manila*	*Peschiera*	*Ancona*					
1	3804	23	*pomona* 1/6400	*icterohaem.* 1/3200 *autumnalis* 1/1600 *sejroe* 1/100	1/1024	1/256	1/16	0	1/64	—	9	*L. pomona* 1/1600 *L. sejroe* 1/400 *L. autumn.* 1/200 *L. ballum* 1/200	1/4096
2		48	1/12.800	*icterohaem.* 1/1600 *autumnalis* 1/800	1/128	0	0	0	0	1/1024			
3	3861	35	1/800	*sejroe* 1/400 *ballum* 1/200 *icterohaem.* 1/100 *autumnalis* 1/100	1/256	1/8	1/4	0	0	—	8	*L. ballum* 1/100	1/32
4	3472	14	1/800	*sejroe* 1/200 *icterohaem.* 1/100 *autumnalis* 1/100	1/64	0	0	0	0	—	9	0	—
5	3828	29	1/1600	*autumnalis* 1/800 *sejroe* 1/200 *ballum* 1/100	1/128	0	0	0	0	—	10	*L. sejroe* 1/100 *L. pomona* 1/100	1/128
6	4309	29	1/51.200	*austral. A.* 1/6400 *icterohaem.* 1/3200 *autumnalis* 1/3200 *sejroe* 1/1600 *hyos* 1/200 *grippotyph.* 1/100 *poi* 1/100	1/128	0	0	0	0	—	10	*L. pomona* 1/400	1/32
7	3652	16	1/3200	*sejroe* 1/400 *icterohaem.* 1/200 *grippotyph.* 1/100 *autumnalis* 1/100 *poi* 1/100	1/512	1/256	0	0	0	—	10	0	1/32
8	3593	11	1/3200	*grippotyph.* 1/800 *sejroe* 1/800 *icterohaem.* 1/400 *autumnalis* 1/100	1/1024	1/128	0	0	1/64	—			
9	3524	17	1/1600	*sejroe* 1/800 *grippotyph.* 1/400 *autumnalis* 1/100	1/512	1/256	1/16	0	1/4	—	8	*L. sejroe* 1/100	1/32
10	3764	14	1/800	*autumnalis* 1/400 *icterohaem.* 1/100	1/128	1/64	1/16	0	1/4	—			
11	3900	23	*sejroe* 1/100	0	1/16	0	0	1/16	0	—	16	0	1/4
12	3358	?	1/100	0	1/64	0	1/8	0	0	—			
13	3825	25	1/100	0	1/32	1/32	1/4	0	1/32	—			
14	3927	7	1/100	0	1/16	1/4	1/4	0	1/4	—			
15	3885	11	1/800	*pomona* 1/100	1/256	1/256	1/16	1/8	1/128	—	8	0	0
16	4171	12	1/6400	*austral. A.* 1/3200 *autumnalis* 1/400 *icterohaem.* 1/400 *poi* 1/400	1/512	1/512	0	0	1/128	—			
17	3887	21	1/1600	0	1/256	1/8	0	0	1/8	—	8	0	1/8
18	3713	14 18 ›	1/3200	*poi* 1/1600	1/1024	0	0	0	0	—	6 10 ›	0	1/16
19	3822	13	1/3200	*hebd.* 1/100 *ballum* 1/100	1/512	1/128	0	0	1/64	0	8	0	1/8
20	171/1960	33	1/6400	*hebd.* 1/3200	1/64	1/16	0	0	0	0			
21	3679	19	*icterohaem.* 1/400	*pomona* 1/200 *autumnalis* 1/200 *sejroe* 1/200	1/1024	1/256	1/32	0	1/128	—	9	0	1/8
22	3925	21	*bataviae* 1/25.600	*icterohaem.* 1/1600 *ballum* 1/1600 *sejroe* 1/800	1/512	1/32	0	0	0	—			
23	3450	10	*hyos* 1/1600	*sejroe* 1/400 *pomona* 1/100	1/64	0	0	0	0	—	14	*L. hyos* 1/3200 *L. sejroe* 1/1600 *L. pomona* 1/400 *L. ballum* 1/400 *L. poi* 1/400 *L. grippotyph.* 1/200	1/256
24	4303	?	1/25.600	*sejroe* 1/1600 *austral. A.* 1/1600 *autumnalis* 1/1600 *poi* 1/200 *grippotyph.* 1/200 *icterohaem* 1/400	1/1024	1/256	1/8	0	1:128	—			
25	4305	13	*grippotyph.* 1/12.800	*autumnalis* 1/3200 *hyos* 1/1600 *austral. A.* 1/1600 *poi* 1/1600 *icterohaem.* 1/100 *canicola* 1/100	1/512	1/512	0	0	1/128	—			
26	3947	?	*poi* 1/400	*grippotyph.* 1/100 *pomona* 1/100 *batavia* 1/100	1/256	1/256	1/16	1/8	1/128	—			
27	3802	8		*non- determined* *sejroe* 1/100 *poi* 1/100	1/128	0	0	0	0	—			
28	3336	7—9 ?		*pomona* 1/800 *sejroe* 1/800 *grippotyph.* 1/200	1/1024	1/128	0	0	1/64	—	10 12 ?	*L. sejroe* 1/3200 *L. pomona* 1/400 *L. ballum* 1/800 *L. poi* 1/800 *L. grippotyph.* 1/200	1/4096
29	3847	43		*canicola* 1/1600 *ballum* 1/1600 *icterohaem.* 1/100	1/128	1/16	0	0	0	—	15	*L. ballum* 1/1600 *L. canicola* 1/400 *L. sejroe* 1/400	1/512
30	59/960	12		*grippotyph.* 1/400 *autumnalis* 1/400	0	0	0	0	0	—			

A reduced number of swine sera with a positive ALT (1/6400—1/128.000 *hyos* or *L. pomona*) showed negative CFT results with biflexa Patoc antigen, ough they fixed the complement (1/16—1/32) for the *L. hyos* and *L. pomona* tigens. Similar negative CFT results with the biflexa Patoc antigen, and posi- e with the hyos antigen (1/32) were obtained with the sera of 5 cows, positive r *L. hyos*.

DISCUSSION

Prior observations showed that *L. biflexa* Patoc frequently reacts in the ALT th sera from leptospirosis patients.

From the last investigations it results that this strain reacts more often in e CFT with human leptospiral sera, and also with immune rabbit sera against great number of various serotypes.

In order to see if this character is peculiar to the saprophytic leptospira, d if among the pathogenic leptospira there exist some with a similar wide- read action, antigens of different serotypes ought to be tested by the comple- nt fixation, just as the acvicole leptospira should be investigated more closely.

If *L. biflexa* Patoc possesses an antigen in common with the pathogenic otospira, differing qualitatively or quantitatively from *L.* madida, and *L. sema- ng*, with which, according to the actual method of classification it should nge into the same group, remains to be seen.

For the present, *L. biflexa* Patoc appears to have a more active polyvalence an the other 4 strains studied in this paper.

Fixing of a delimitation line between the saprophytic and pathogenic types not without importance. Encouraging in this direction are the investigations BERTOK and KEMENES (4), relatively to the differences of the enzymatic equip- nt among the acvicole and pathogenic leptospira group, as well as those PENTEK-JUHASZ (11) on the hemotoxin with a selective action on the red lls of mice in the acvicole leptospira.

There exist however many aspects which tend to obliterate a precise limit tween the saprophytic and pathogenic leptospira. In 1932 ERBER (9) detected glutinines for *L. biflexa*, (Vincent, Tokyo and Erlangen) in horses, rats and mon- ys. ACANFORA (1) likewise detects them in 1939 in guinea-pigs inoculated th *L. icterohaemorragiae*.

Among the pathogenic serotypes, *L. semarang* grows abundantly and easily. RMSTRONG and GOLDBERG (2) describing 6 types of colonies in leptospira ltured on solid media find similar morphological characters in colonies of *biflexa* and *L. semarang*.

The hemosensitizing antigen obtained by COX from a biflexa leptospira well as the reaction of the biflexa Patoc, madida and Peschiera, plead for the istence of a common antigen in the saprophytic and pathogenic group.

The fact that strains apparently of the same serological group behave dif- ently when used as complement fixing antigens, proves the existence of antigenic fraction, as yet undetectable to present methods of classification.

On the other hand, the mode of reaction of sera from different animal species, mplicates still more the biological study of the antigenic composition of this icroorganism.

Among the controled antigens, the one prepared with *L. biflexa* Patoc reveals itself as being the most sensitive, and from experiments carried out until now, is useful in the detection of human leptospirosis.

The verification of its sensitivity and specificity can be only proved by the control on a large scale in cases of human leptospirosis, in normal individuals and in various other febrile diseases.

The testing of different serotypes as polyvalent antigens will perhaps lead to the discovery of some antigens useful for a rapid detection of leptospiroses in animals, which is of considerable importance both in epizootology as in epidemiology.

REFERENCES

1. Acanfora, G. — Ann. d'Igiene, 1939, **49,** 1.
2. Armstrong, J. C. and Goldberg H.S. — Am. J. Vet. Res., 1960. **21,** 311.
3. Bengtson, I. — Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1941, **46,** 665.
4. Bertok, L. and Kemenes F. — Acta Microbiol. Hung. 1960, **7,** 251.
5. Combiesco, D., Sturdza N. and Radu I. — Studii şi Cercet. Inframicrobiol., Parazitol., 1957, **8,** 601.
6. Combiesco, D., Sturdza, N., Sefer, M. and Klipper A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960. **19,** 201.
7. Combiesco, D., Sturdza, N., Sefer, M. and Radu, I. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 245.
8. Cox, C.D. — J. inf. Dis., 1957, **101,** 203.
9. Erber, B. — C.R. Soc. Biologie, 1932, **109,** 165.
10. Kmety, E. — Zblt. f. Bakt., Orig. I, 1957, **170,** 597.
11. Pentek-Juhasz, M. — Acta Vet. Hung., 1960. **10,** 233.
12. Sturdza, N., Elian, M. and Tulpan, G. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19,** 571.
13. Varfolomeeva, A.A. — Jurn. Epid., Microbiol., Immunol. Prague, 1958, **2,** 50.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗНЫХ ШТАММОВ *L. biflexa* ПРИМЕНЯЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА ДЛЯ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗАХ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изготовили концентрированные, обработанные мертиолатом суспензии из 4 штаммов *L. biflexa* и один штамм патогенных лептоспир (*L. semarang*) в виду испытания чувствительности данных взвесей в качестве поливалентного, гетерологического антигена в реакции связывания комплемента с сыворотками против лептоспир.

28 кроличьих типовых иммунных сывороток (разные серотипы) и 100 человеческих сывороток испытывались в реакции связывания комплемента с 5 изготовленными антигенами, сравнительно с реакцией агглютинации — лизиса с лептоспирами гомологичного серотипа для иммунных сывороток и с 12 разными серотипами для человеческих сывороток.

Проведенные испытания дали возможность установить, что антиген приготовленный из штамма *L. biflexa* Patoc связывает комплемент в присутствии 85,71% кроличьих типовых иммунных сывороток и в присутствии 95% человеческих сывороток положительных в реакции агглютинации-лизиса, независимо от серотипа.

Штаммы *L. biflexa* madida и *L. semarang* несмотря на то, что находятся в близком антигенном родстве с *L. biflexa* Patoc обладают более узкими поливалентными антигенными свойствами в реакции связывания комплемента, причём антиген *L. semarang* реагирует только с 27,5% кроличьих иммунных сывороток.

Штамм *L. biflexa* Peschiera, отличающаяся с антигенной точки зрения от других штаммов, применяемых в качестве антигенов для реакции связывания комплемента, реагировал по отношению к кроличьим иммунным сывороткам в 75% случаев и только в 30% с человеческими сыворотками, положительными в реакции агглютинации-лизиса.

ÉTUDE COMPARATIVE DE DIVERSES SOUCHES DE *L. BIFLEXA* COMME ANTIGÈNE POUR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT DANS LES LEPTOSPIROSES

RÉSUMÉ

Des suspensions concentrées et merthiolées à partir de 4 souches de *L. biflexa* et d'une souche de *L.* pathogène *(L. semarang)* ont été comparées comme antigène dans la réaction de fixation du complément (RFC) vis-à-vis des sérums antileptospires pathogènes.

La RFC a été exécutée avec 28 sérums immuns (sérotypes différents) de lapin et 100 sérums humains. Ces sérums ont été comparativement contrôlés par la réaction d'agglutino-lyse (RAL) avec les souches homologues pour les sérums immuns et avec 12 sérotypes pathogènes pour les sérums humains.

Les résultats démontrent que l'antigène préparé avec .la souche *L. biflexa* Patoc fixe le complément en présence de 85,71% des sérums immuns, et de 95% des sérums humains positifs à la RAL, indifféremment du sérotype.

Les souches *L. biflexa* madida et *L. semarang*, bien qu'antigéniquement apparenté avec *L. biflexa* Patoc, ont une valeur antigénique polyvalente beaucoup plus restreinte dans la RFC. L'antigène à *L. semarang* donne des RFC positives seulement avec 27,5% des sérums immuns de lapin.

La souche *L. biflexa* Peschiera, différente du point de vue antigénique, a réagi vis-à-vis des sérums de types immuns de lapin dans 75% des cas et seulement dans 30% vis-à-vis des sérums humains positifs à la RAL.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER STÄMME VON *L. BIFLEXA* ALS ANTIGEN FÜR DIE KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION BEI LEPTOSPIROSEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden konzentrierte Aufschwemmungen von 4 Stämmen von *L. biflexa* und einem pathogenen Leptospirenstamm *(L. semarang)* unter Merthiolatzusatz hergestellt, um deren Empfindlichkeit als heterologe polyvalente Antigene in der Komplementbindungsreaktion mit Antileptospirensera zu prüfen.

Die Komplementbindungsreaktion wurde bei 28 durch die Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenen Serotypen gewonnen Immunsera und bei 100 menschlichen Sera ausgeführt und mit der Agglutination-Lysereaktion mit Leptospiren des homologen Serotypus bei den Immunsera oder mit 12 verschiedenen Serotypen bei den Menschensera verglichen.

Aus den erhaltenen Ergebnissen geht hervor, dass das mit dem Stamm *L. biflexa* Patoc hergestellte Antigen Komplement in der Gegenwart von 85,71% der Immuntypensera, von Kaninchen bezw. von 95% der in der Agglutination-Lysereaktion positiven Menschensera, unabhängig von Serotypus bindet.

Obgleich die Stämme *L. biflexa* madida und *L. semarang* mit *L. biflexa* Patoc antigenisch eng verwand sind, weisen sie in der Komplementbindungsreaktion eine viel beschränktere polyvalente Reichweite auf. Das Semarangantigen reagiert nur mit 27,5% der Kaninchenimmunsera.

Der von den anderen, bei der Komplementbindungsreaktion verwendeten Stämmen antigenisch verschiedene Stamm., *L. biflexa* Peschiera reagierte in 75,5% der Fälle mit den Typenimmunsera von Kaninchen und nur in 30% der Fälle mit den in der Agglutination-Lysereaktion positivem Menschensera.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES INCLUSIONS PROTOPLASMATIQUES DE LA MÉDULLO-SURRÉNALE DE L'HOMME

par

C. Bonciu, Al. Ionesco et V. Beliş

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Anatomie Pathologique et de la Chaire de Médecine Judiciaire de l'Institut Médico-Pharmaceutique-Bucarest.

— Manuscrit reçu le 9 février 1960 —

Les inclusions protoplasmatiques de la médullo-surrénale ont été depuis ngtemps décrites, chez l'homme et chez les animaux, leur étude étant néanins limitée.

En 1909, Oberndorfer observant en cas de maladies infectieuses chez omme, dans le protoplasma des cellules de la médullo-surrénale, des formations ndes, homogènes, éosinophiles, de dimensions variables, parfois localisées ns une vacuole protoplasmatique, les a considérées comme étant des globules rouges phagocités (?); Lubarsch, Dietrich et Sigmund (3), ont considéré ces mêmes formations comme étant de nature sécrétoire pathologique.

En 1908, Celestino Da Costa (2), a décrit les mêmes formations (corpuscules, inclusions) protoplasmatiques dans la médullo-surrénale des cobayes inoculés avec du virus rabique, les considérant comme identiques aux corpuscules de Babeş-Negri du système nerveux central; Ségée (cité par Da Costa) a émis l'opinion que ces formations ne seraient pas des corpuscules rabiques ne possédant pas la structure fine de ces derniers (granulations bleues très nes dans la masse corpusculaire, colorée en rouge intense -coloration de Mann).

Celestino Da Costa (2) cite également les travaux de Gvormavigg et aut (1921), qui ont décrit de pareilles inclusions chez les cobayes inoculés c de l'insuline, et ceux de Hoen (1931) qui les a observées chez les cobayes oculés avec de la toxine diphtérique ou d'autres toxines microbiennes.

En 1929 et 1931, Hirai (4) a observé et décrit de telles inclusions chez fférentes espèces animales (cheval, rat, lapin, chat, chien, porc et bovidés).

En 1946, Celestino Da Costa et Gualdes Barba, reprennant ces études cobayes injectés avec du virus rabique et de la toxine diphtérique, émettent cette fois l'opinion que les inclusions observées sont d'origine protoplasmatique, pareilles à la réaction cellulaire envers un parasite (virose latente), et qu'elles dériveraient des granules normalement préexistantes dans le protoplasma; ils citent également Brumpt, dont l'opinion est que ces inclusions ressemblent aux formes évolutives des rickettsia (décrites par Carpano et

Sestoquard, jiroud, etc.) et qu'elles seraient, par conséquent, de nature parasitaire.

En 1960, Bonciu et coll. (1) ont entrepris des recherches sur cobayes, dans cette direction, arrivant aux conclusions suivantes: les inclusions protoplasmatiques des médullo-surrénales ne sont pas caractéristiques pour certaines viroses, pouvant se trouver dans les différentes maladies microbiennes ou parasitaires, dans les avitaminoses et même dans les lésions organiques produites par certaines substances chimiques; elles sont d'origine distrophique, en rapport avec les granulations chromaffines et la sécrétion de l'adrénaline, se trouvent chez les animaux à sang chaud et sont totalement absentes chez les animaux à sang froid. Ces inclusions sont toujours accompagnées de lésions infiltratives, dégénératives ou hémorragiques.

Afin de compléter cette étude, nous avons repris nos recherches, cette fois sur l'homme, ayant l'occasion d'observer un grand nombre de cas présentant les aspects pathologiques les plus variés.

★

Nos recherches ont été effectuées sur 118 cas, dont 15 enfants (7 fillettes et 8 garçons) et 103 adultes (55 hommes et 48 femmes), répartis par rapport à l'âge comme suit:

Nouveaux-nés	—	2 (1 fillette	— 1 garçon)
1—12 mois	—	9 (4 fillettes	— 5 garçons)
1—12 ans	—	4 (2 fillettes	— 2 garcons)
20—30 ans	—	7 (3 femmes	— 4 hommes)
31—40 ans	—	9 (4 femmes	— 5 hommes)
41—50 ans	—	14 (4 femmes	— 10 hommes)
51—60 ans	—	19 (4 femmes	— 15 hommes)
61—70 ans	—	16 (10 femmes	— 6 hommes)
71—80 ans	—	20 (14 femmes	— 6 hommes)
81—90 ans	—	14 (9 femmes	— 5 hommes)
91—95 ans	—	4 (2 femmes	— 2 hommes)

De ces 118 cas, chez 20 sujets la mort a été violente (5 accidents de circulation, 4 pendaisons, 3 asphyxies par matières alimentaires stomacales, 2 submersions et par un cas de: brûlures multiples, armes à feu, asphyxie avec CO, refroidissements, intoxications à l'alcool éthylique et méthylique).

Dans les autres 98 cas, la mort a été naturelle, due à différentes lésions:

— *Cerveau* — sénile, glyose diffuse, hémorragies, ramollissements (anciens ou récents) encéphalopathies virotiques, microgiries, méningiomes multiples, méningite aiguë et chronique;

— *Epiphyse* — atrophie, sclérose, calcification;

— *Hypophyse* — atrophie, scléro-kystique, hypophysite aiguë, hypofonction;

— *Thyroïde* — atrophie, sclérose, parenchymateuse, adénomateuse, maladie de Basedow, scléro-kystique, kystico-colloïde, goître colloïde, thyroïdite chronique, hypofonction;

— *Parathyroïde* — atrophie, hypofonction;

— *Amygdales* — amygdalite chronique et aiguë, abcès, sclérose, atrophie;

— *Glandes salivaires* — sclérose, atrophie;
— *Mamelle* — sclérose, atrophie;
— *Poumon* — emphysème, corps amylacés, sclérose, bronchectasies, anthracose, broncho-pneumonie, pneumonie, abcès, tuberculose, pneumonie interstitielle virotique, épithélioma, aspiration de liquide amniotique, bronchite, pleurite fibrino-purulente;
— *Coeur* — myocardite aiguë et chronique, infarctus (ancien ou récent), dégénérescences pigmentaire et grasse, sclérose, thrombo-endocardite, sclérose valvulaire;
— *Vaisseaux* — aortite chronique athéromateuse, syphilitique et sclérogène, artériosclérose généralisée, artérite syphilitique, sclérose des veines;
— *Système lymphatique* — atrophie, anthracose, adénite aiguë et cronique, sclérose, amyloïde, tuberculose, calcification, métastases, épithélioma;
— *Sang* — leucémie myélogènet lymphatique;
— *Pancréas* — atrophie, sclérose, pancréatite chronique, épithélioma;
— *Surrénales* — atrophie, hypertrophie, sclérose, hémorragies, lésions dégénératives, surrénalite chronieque, tuberculose, adénome cortical épithélioma métastatique, paragangliome, malin;
— *Foie* — atrophie, cirrhose hépatite aiguë, sous-aiguä et chronique, abcés, lésions dégénératives infiltration grasse, tuberculose, kyste hydatique, épithélioma primitif et mètastatique, cholécystite chronique, calculs;
— *Reins* — néphrite aiguë, sous-aiquë et chronique, rein artériolo-sclérotique, atrophie, sclérose, tuberculose, pyélonéphrite aiquë purulente, malformations congénitales, cystite chronique;
— *Rate* — sclérose, atrophie, hynalinose, amyloïde, abcès, rate septique, tuberculose;
— *Estomac* — gastrite chronique, ulcère chronique, épithélioma;
— *Intestin* — colite chronique, rectite tbc, entèrocolite aiguë, atrophie de la muqueuse;
— *Utérus* — endométrite, sclérose, atrophie, épithélioma, chorioépithélioma, fibromyome, endométriome;
— *Ovaires* — sclérose, cholestérinome;
— *Trompes* — pyosalpinx, sclérose, atrophie;
— *Testicule* — sclérose, atrophie;
— *Prostate* — sclérose, atrophie, hypertrophie, prostatite chronique;
— *Péritonite* — aiguë ou tbc, mètastases épithélioma;
— *Hérédo-syphilis, morbe de Pott, syndrome hémorragipare, tétanos, cachéxie.*

Dans 16 cas, sur les 118 étudiés, on a réussi à mettre en évidence la présence des inclusions protoplasmatiques dans les cellules médullo-surrénales ou dans les capillaires sanguins des sinus (seulement à la suite des morts naturelles).

Nous relatons ces cas:

1. *I.M.J. 286* — homme, 46 ans: *Examen anatomo-pathologique:* bronchopneumonie massive, pleurite fibrino-purulente, rate septique, hépatite aiguë, myocardite aiguë, néphrite aiguë, adénite aiguë trachéobronchique;

Surrénales : médullaire — forte hyperémie, infiltration avec mononucléaires et polynucléaires, légères lésions dégénératives; une des médullaires a présenté de rares inclusions

protoplasmatiques, grandes et moyennes, intra et extracellulaires (dans les capillaires des sanguins);

corticale : — lésions dégénératives discrètes, lipoïdes accrus.

2. *I.M.J. 973* — homme 57 ans, mort subite: *Examen anatomo-pathologique :* hémorragies pulmonaires (grippe) et emphysème, rate hémorragique, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, myocardite chronique scléreuse (aussi des infarctus sclérosés), néphrite aiguë, hépatite aiguë, prostate hypertrophiée;

Surrénales: médullaire — forte hyperémie, infiltration diffuse et nodulaire avec mono et rares polynucléaires, lésions dégénératives, de très rares inclusions protoplasmatiques, grandes, intracellulaires;

corticale: — congestion, micro-hémorragies dans la zone de passage de la corticale à la médullaire avec lésions dégénératives, fréquents lipoïdes, fréquentes cellules dans la zone réticulée à pigment jaune-brun.

3. *I.M.J. 419* — homme, 60 ans. *Examen anatomo-pathologique:* foyers pneumoniques et hémorragiques (grippe), rate scléreuse hémorragique, aortite chronique athéromateuse et syphilitique, artério-sclérose généralisée, goître kystique, glomérulonéphrite aiguë hémorragique, myocardite aiguë, hépatite chronique sclérogène, pancréatite chronique scléreuse, gastrite chronique.

Surrénales : médullaire — congestion, micro-hémorragies, légère infiltration avec mono et rares polynucléaires, lésions dégénératives, rares inclusions protoplasmatiques intracellulaires (de dimensions variées allant de petites aux grandes). (Photo 1).

Corticale — nombreux lipoïdes.

4. *I.M.J. 144* — homme, 59 ans. *Examen anatomo-pathologique :* foyers pneumoniques avec tendance à abcéder (grippe), aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, rate scléreuse avec légères hémorragies, hépatite sous-aiguë, glomérulo-néphrite aiguë.

Surrénales : médullaire — congestion très légère, infiltration avec mono et rares polynucléaires, rares inclusions, petites et moyennes, intra et extracellulaires. (Photo 2)

corticale — beaucoup de lipoïdes, fréquentes cellules de la zone réticulaire, à pigment jaune-brun.

5. *I.M.J. 150* — homme, 60 ans. *Examen anatomo-pathologique :* foyers pneumoniques avec abcès et hémorragies, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, rate septique, cirrhose hépatique avec infiltration grasse, myocardite aiguë, reins artériolo-scléreux.

Surrénales : médullaire — hyperémie, légère infiltration avec mono, lésions dégénératives, rares corpuscules, grands, intra et extracellulaires. (Photo 3).

Corticale — fréquents lipoïdes.

6. *I.M.J. 1022* — femme, 36 ans. *Examen anatomo-pathologique:* emphysème pulmonaire, myocardite chronique , insuffisance et sténose mitrale et aortique (sclérose valvulaire), rate septique hémorragique, glomérulo-néphrite aiguë, amygdalite chronique cryptique;

Surrénales : la médullaire (en totalité) et la corticale (en partie, zone intérieure) sont transformées en une masse nécrotique avec infiltrations tout autour de: mono et polynucléaires, cellules épithélioïdes, rares cellules géantes multinucléées (Langhans) et avec réaction fibroblastique (tbc) autour, nombreux lipoïdes;

médullaire — légère infiltration diffuse et nodulaire avec mono et rares polynucléaires, très rarement de grandes inclusions intracellulaires (Photo 4);

corticale — lipoïdes fréquents.

7. *I.M.J. 111*, femme, 80 ans. *Examen anatomo-pathologique :* foyers pneumoniques, pleurite fibrino-leucocytaire, hépatite aiguë, rate septique, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, thyroïdite chronique scléro-kystique, reins artério-scléreux, cachéxie;

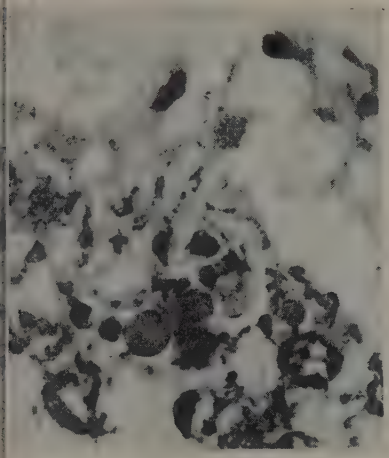
Surrénales : médullaire — congestion, micro-hémorragies, légère infiltration avec mono et rares polynucléaires, très rares inclusions, moyennes, intracellulaires, lésions dégénératives.

corticales : hyperémie, micro-hémorragies, lésions dégénératives, nombreux lipoïdes.

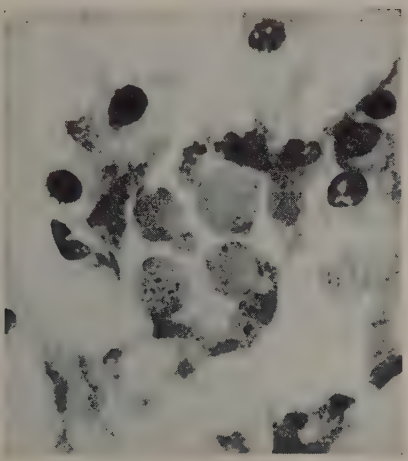
8. *I.M.J. 117* — homme, 56 ans, mort subite: *Examen anatomo-pathologique :* hémorragie cérébrale, foyers pneumoniques, hypophyse avec sclérose diffuse, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, rate avec micro-hémorragies, myocardite chronique, reins artério-scléreux, thyroïde scléro-kystique;

Surrénales : médullaire — hyperémie, très légère infiltration avec mono et rares polynucléaires, rares inclusions, de taille moyenne, intracellulaires;

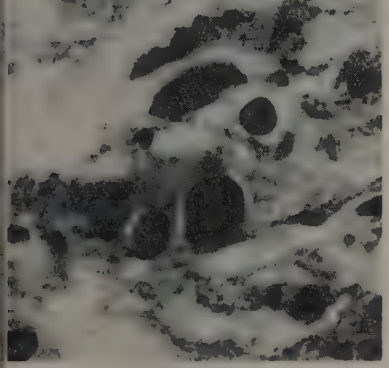
corticale — nombreux lipoïdes.



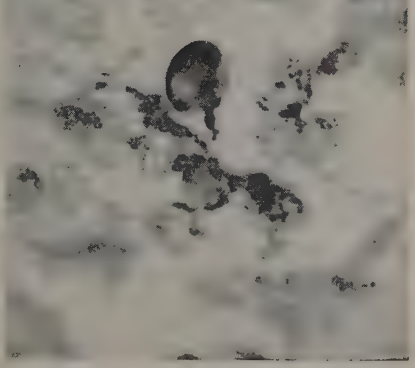
Photographie 1. J.M.J. 419. Médullaire surrénale. Inclusions protoplasmatiques intracellulaires (petites et moyennes) × 900.



Photographie 2 — J.M.J. 144. Médullaire surrénale. Inclusions protoplasmatiques extracellulaires (moyennes) × 900.



Photographie 3 — J.M.J. 150. Médullaire surrénale. Inclusions protoplasmatiques intracellulaires (moyennes et grandes) × 900.



Photographie 4 — J.M.J. 1022. Médullaire surrénale. Inclusions protoplasmatiques extracellulaires (moyennes et grandes) × 900.

9. *I.M.J. 216*, homme, 50 ans. *Examen anatomo-pathologique :* foyers pneumoniques avec petites hémorragies (grippe), oedème cérébral, aortite chronique athéromateuse, artériosclérose généralisée, hépatite aiguë avec infiltration grasse, glomérulo-néphrite aiguë, rate septique avec micro-hémorragies, adénite aiguë trachéo-bronchique;

Surrénales : médullaire — hyperémie, microhémorragies, lésions dégénératives, rares inclusions, de taille moyenne, intra et extra cellulaires;

corticale — nombreux lipoïdes, fréquentes cellules de la zone réticulaire, à pigment jaune-brun.

10. *I.M.J. 342* — homme, 48 ans: *Examen anatomo-pathologique :* broncho-pneumonie, hépatite sous-aiguë avec infiltration grasse, rate septique, artério-sclérose généralisée, myocardite aiguë, néphrite aiguë, thyroïde scléro-kystique, gastrite chronique, adénite aiguë trachéo-bronchique;

Surrénales : médulaire — hyperémie, infiltration avec mono et rares polynucléaires, de très rares inclusions moyennes, intracellulaires, lésions dégénératives;

corticale — rien de particulier à signaler.

11. *I.M.J. 607* — homme — 56 ans. *Examen anatomo-pathologique* — ulcère calleux de l'estomac à transformation maligne, épithélioma atypique et adénoïde mucipare avec forte réaction conjonctive et métastases dans les poumons, le pancréas, le foie et les surrénales, foyers pneumoniques, hépatite sous-aiguë;

Surrénales : médullaire — congestion, microhémorragie, infiltration diffuse et nodulaire avec mono et polynucléaires, rares inclusions moyennes, intracellulaires;

corticale — épithélioma atypique et adénoïde mucipare avec réaction fibroblastique prononcée.

12. *G. 5* — femme, 70 ans: *Examen anatomo-pathologique :* tuberculose généralisée (poumon, foie, rate, ganglions trachéo-bronchiques), foie avec infiltration grasse, cholécystite chronique, rate scléreuse, myocardite chronique, thyroïde scléro-kystique, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, reins artério-scléreux, atrophie de la muqueuse du tube digestif, atrophie du système lymphatique, sclérose de l'utérus, des trompes et des ovaires, sclérose mammaire.

Surrénales : diminuées de volume (atrophiques).

médullaire — hyperémie, légère infiltration avec mono et rares polynucléaires, lésions dégénératives, de très rares et petites inclusions intracellulaires.

corticale — réduite, capsule épaissie, rares lipoïdes.

13. *G. 6* — femme, 85 ans: *Examen anatomo-pathologique :* sclérose pulmonaire massive, bronchéctasie avec bronchite purulente, myocardite chronique scléreuse, adénite chronique scléreuse trachéo-bronchique, hypophyse scléro-atrophique, thyroïde scléro-kystique, rate septique scléreuse, hépatite sous-aiguë, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, glomérulo-néphrite chronique, atrophie de la muqueuse du tube digestif, atrophie du système lymphatique, utérus scléro-atrophique, ovaires scléro-kystiques, amygdales scléreuses, pancréas et glandes salivaires scléro-atrophiques, sclérose mammaire;

Surrénales: réduites de volume (atrophiées)

médullaire — hyperémie, légère infiltration avec mono et rares polynucléaires, rares inclusions, moyennes et petites, intra et extracellulaires;

corticale — réduite, capsule épaissie, les zones glomérulaires et réticulaires quasi inexistantes, la zone trabéculaire intacte avec nombreux lipoïdes.

14. *G. 3.* — femme, 86 ans: *Examen anatomo-pathologique:* broncho-pneumonie, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, foie scléro-atrophique, cholangite chronique, thyroïde parenchymateuse, rate scléreuse, hypophyse et épiphyse scléro-atrophiques, reins artério-scléreux, glandes salivaires, pancréas, utérus, trompes-scléro atrophiques, ovaires scléreux.

Surrénales: très diminuées de volume (atrophiques)

médullaire — réduite, hyperémie, cellules atrophiées avec lésions dégénératives, infiltrations avec mono, plasmazellen et rares polynucléaires, tissu conjonctif interstitiel hyperplasié. Vaisseaux avec les parois épaissies et sclérosées, rares inclusions intra et extra-cellulaires de dimensions moyennes.

corticale — réduite, capsule très épaissie et sclérosée, zone glomérulaire réduite, quasi-inexistente avec cellules atrophiées, zone trabéculaire réduite avec nombreux lipoïdes, zone réticulaire fortement diminuée avec cellules atrophiques, tissu conjonctif interstitiel hyperplasié.

15. *G. 20* — homme, 79 ans: *Examen anatomo-pathologique :* pneumonie lobaire bilatérale et tuberculose caséeuse, cerveau sénil, hypophyse et épiphyse scléro-atrophiques, thyroïde colloïdo-kystique, myocardite chronique et atrophie, aortite chronique athéromateuse, artério-sclérose généralisée, hépatite sous-aiguë avec atrophie et tbc, rate scléreuse septique et tbc, cholécystite chronique scléreuse lithiasique, néphrite chronique, testicules atrophiques, atrophie

la muqueuse du tube digestif, atrophie du système lymphatique, ossification du ligament o-hyoïdien.

Surrénales : médullaire — congestion, légère infiltration diffuse avec mono et rares poly- léaires, légère hyperplasie du tissu conjonctif interstitiel, rares inclusions intra et extracel- laires, de dimensions moyennes;

corticale — congestion, capsule épaissie, rares lipoïdes, rares cellules avec pigment jaune- n dans la zone réticulaire.

16. *G. 26* — femme, 60 ans: *Examen anatomo-pathologique :* cerveau sénile, épiphyse hypophyse scléreuses, thyroïde scléro-kystique, emphysème pulmonaire, alvéolite catarrhale péribronchite chronique, adénite tbc trachéo-bronchique, myocardite chronique scléreuse c infarctus (récent et ancien), thrombo-endocardite, insuffisance et sténose mitrale (anneau creux calcifié), aortite chronique athéromateuse ulcérative, artério-sclérose généralisée, hépa- sous-aiguë, rate septique scléreuse, néphrite chronique, amygdalite chronique scléreuse, rus scléreux, atrophie du système lymphatique, atrophie de la muqueuse du tube digestif.

Surrénales : augmentées de volume (hypertrophiées).

médullaire — agrandie, hyperémie massive, légère infiltration diffuse avec mono, rares smazellen et polynucléaires, parois vasculaires épaissies et sclérosées, rares inclusions intra extracellulaires (petites et moyennes);

corticale — agrandie, capsule épaissie, nombreux lipoïdes et fréquentes cellules à pigment ne-brun dans la zone réticulaire, tissu conjonctif interstitiel légèrement hyperplasié.

En dehors des lésions décrites, on a observé dans les autres cas, au niveau s surrénales les aspects anatomo-pathologiques suivants:

Examen macroscopique: atrophie des surrénales (20 cas), hypertrophie des rrénales (10 cas), para-gangliome malin (1 cas) et métastases épithélioma- uses (1 cas).

Examen microscopique: a) *corticale* (par ordre de fréquence): multi- cation de la masse des lipoïdes, lésions infiltratives, capsule épaissie, aspect atrophie, pigment jaune-brun dans les cellules de la zone réticulaire; hyper- asie conjonctive (diffuse, trabécules, plaques), lésions dégénératives, hémorra- es, formations adénomateuses, macrophages ferriques, etc.;

b) *médullaire* — (par ordre de fréquence): lésions infiltratives, aspects atrophie, lésions dégénératives, hyperplasie du tissu conjonctif (diffuse et plaques), hémorragies, macrophages ferriques, etc.

DISCUSSION DES OBSERVATIONS

De l'étude des 118 cas on constate:

1. Chez les enfants on n'a trouvé dans aucun cas des inclusions proto- asmatiques dans les cellules de la médullo-surrénale (15 cas étudiés).

2. Chez les adultes on a observé ces inclusions dans 16 sur 103 cas étudiés, nt 6 chez les femmes (37,5%) et 10 chez les hommes (62,5%); si l'on tient mpte du nombre des cadavres de femmes examinés (48, respectivement ,6%) et du nombre des cadavres masculins étudiés (55, respectivement 53,4%), apparaît que les inclusions protoplasmatiques sont plus fréquentes chez les mmes que chez les femmes.

3. Par rapport à l'âge, les 16 cas se partagent:

de	31 à 40 ans	— 1 cas	(femme)
	41 » 50 ans	— 3 cas	(hommes)
	51 » 60 ans	— 7 cas	(6 hommes et 1 femme)
	61 » 70 ans	— 1 cas	(femme)
	71 » 80 ans	— 2 cas	(1 homme et 1 femme)
	81 » 90 ans	— 2 cas	(2 femmes)

donc, jusqu'à 50 ans on n'a observé des inclusions que dans 4 cas (25%), le reste de 12 (75%) se situent au-dessus de 50 ans; en tenant compte du nombre de cas étudiés (38% jusqu'à 50 ans et 62% au-dessus de 50 ans) on peut affirmer que ces inclusions sont plus fréquentes chez les sujets ayant dépassé la cinquantaine.

4. En ce qui concerne les principales lésions des organes (cause de la mort) qui sont accompagnées d'inclusions protoplasmatiques, nous signalons:

a) broncho-pneumonies, pleurésies, rate septique;

b) hémorragies pulmonaires (grippe);

c) foyers pneumoniques, pleurésie, hémorragies pulmonaires et spléniques (grippe);

d) foyers pneumoniques (abcès), hémorragies dans la rate (grippe);

e) foyers pneumoniques (abcès) et hémorragies, sépticémie.

f) septicémie, tbc des surrénales (unilatérale);

g) foyers pneumoniques, pleurésie, septicémie;

h) foyers pneumoniques, hémorragies dans la rate;

i) foyers pneumoniques et hémorragies, rate septique, foie gras (grippe);

j) broncho-pneumonie, septicémie, foie gras;

k) foyers pneumoniques, épithélioma gastrique avec nombreuses métastases, foie gras;

l) tbc généralisée (poumon, foie, rate, ganglions);

m) septicémie;

n) broncho-pneumonie;

o) pneumonie lobaire bilatérale, tuberculose pulmonaire caséeuse et tbc du foie et des ganglions, septicémie;

p) septicémie et tuberculose des ganglions trachéo-bronchiques.

A remarquer que dans la majorité des cas les inclusions protoplasmatiques se trouvent dans les cas de pneumopathies aiguës avec différentes complications (avec ou sans grippe) et plus rarement dans les cas de: grippe (sans complications inflammatoires pulmonaires), états septicémiques, épithélioma généralisé, foie gras, tbc surrénale, tbc généralisée.

En plus, si l'on considère que les inclusions sont plus fréquentes chez les sujets qui ont dépassé 50 ans, il paraîtrait qu'il existe une cause prédisposante: l'état de sclérose généralisée des vaisseaux et organes et, éventuellement, l'atrophie des organes qui favorisent l'apparition de telles inclusions par les troubles circulatoires et fonctionnels.

En ce qui concerne les lésions locales des surrénales, qui accompagnent l'apparition des inclusions, il faut retenir:

Médullaire:

1. Dans la majorité des cas, lésions infiltratives, plus ou moins prononcées, d'habitude avec mononucléaires, et rares polynucléaires et dans certains cas, rares plasmazellens (15 sur 16 cas).

2. Lésions dégénératives, plus ou moins prononcées (9 sur 16 cas).

3. Lésions hémorragiques, habituellement de proportions réduites (5 sur 16 cas).

4. Rarement des aspects atrophiques, hyperplasie du tissu conjonctif (diffuse, trabéculaire ou en plaques) avec lésions vasculaires (sclérose, épaississement) et tbc.

Les inclusions se trouvent d'habitude en nombre réduit (rares ou très rares), le plus souvent de dimensions moyennes (rarement petites ou grandes), leur

lisation intracellulaire est plus fréquente, elles s'observent moins souvent dans capillaires sanguins des sinus de la médullaire et jamais dans la circulation guine (organes) ou dans la rate.

Corticale: Dans la majorité des cas, peu lésée, en général les lipoïdes sont mentés (10 cas sur 16); en plus, on a rarement observé des lésions dégénéra-ves, légères hémorragies, accumulation de pigment jaune-brun dans les cellules la réticulaire, aspects atrophiques, hyperplasie du tissu conjonctif (diffuse, écules ou en plaques), capsule épaissie, épithélioma métastatique, tbc.

CONCLUSIONS

L'étude des inclusions protoplasmatiques de la médullo-surrénale de l'homme 3 cas) permet les conclusions suivantes:

1. Chez les enfants, de moins de 12 ans, on n'a trouvé dans aucun cas inclusions protoplasmatiques (15 cas étudiés).

2. Chez les adultes on a trouvé ces inclusions dans 16 des 103 cas étudiés, nt plus fréquentes chez l'homme que chez la femme.

3. Ces inclusions sont plus fréquentes à partir de 50 ans, probablement ause de la sclérose généralisée des vaisseaux et des organes, ainsi qu'aux lésions ophiques des organes (cause prédisposante).

4. Les inclusions dans la médullo-surrénale ont été observées en cas de: ladies aiguës microbiennes (broncho-pneumonie, pneumonie, abcès, pleurésie, ticémie), maladies microbiennes chroniques (tbc généralisée, tbc des surré-es), maladies virotiques hémorragipares (grippe), épithélioma généralisé et trophie hépatique grasse.

5. Les inclusions protoplasmatiques sont généralement accompagnées de férentes lésions des surrénales: *a)* au niveau de la *médullaire* — lésions infil-tives, lésions dégénératives, hémorragiques; *b)* au niveau de la *corticale* — nom-ux lipoïdes, rares lésions dégénératives et hémorragiques.

BIBLIOGRAPHIE

Bonciu C., Dumitresco R. et Petrovici M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19,** 111.,
Celestino da Costa A. — Bull. Acad. Méd. Paris, 1946, **30,** 392.
Dietrich A. et Sigmund H. — Handbuch der speziellen path. Anat. und Histologie, (Henke F., Lubarsch I.) Drüssen mit innere Sekretion, 1926, **8,** 1018.
Hirai M. — Transactions of the Japanese Pathological Society, 1929, **19,** 1, et 1931, **21,** 162.

ИЗУЧЕНИЮ ПРОТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВКЛЮЧЕНИЙ В МОЗГОВОМ СЛОЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ЧЕЛОВЕКА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучение протоплазматических включений в мозговом слое надпочечников у овека (118 случаев) привело к следующим выводам:

1. Ни в одном случае не обнаружены протоплазматические включения в говом слое надпочечников у детей (до 12 лет).

2. У взрослых эти включения обнаружены в 16-ти случаях, чаще у мужчин, у женщин.

3. Данные включения встречаются чаще после 50-ти лет, вероятно в связи с ерализованным склерозом сосудов и органов и с атрофическими поражениями анов (предрасполагающая причина).

4. Включения в мозговом слое подпочечников встречаются в случаях: острых бактерийных заболеваний, (бронхопневмония, пневмония, абсцессы, плевризия, сепсисы) и хронических (генерализованный туберкулёз, туберкулез надпочечников), вирусные гемор рагические заболевания (грипп), генерализованная эпителиома и жировая дистрофия печени.

5. Наличие данных включений в большинстве случаев сопровождается опражениями надпочечников:

а) в мозговом слое — инфильтративные изменения, дегенеративные, геморрагические поражения.

б) в корковом слое: большое количество липоидов, редко дегенеративные и геморрагические поражения.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER PROTOPLASMAEINSCHLÜSSE IM NEBENNIERENMARK DES MENSCHEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus einem Studium der Protoplasmaeinschlüsse im Nebennierenmark des Menschen (118 Fälle) liessen sich nachstehende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Bei Kindern unter 12 Jahren wurden Protoplasmaeinschlüsse im Nebennierenmark niemals vorgefunden.

2. Bei Erwachsenen wurden diese Einschlüsse in 16 Fällen angetroffen, und zwar öfter bei Männern als bei Frauen.

3. Diese Einschlüsse kommen nach dem 50. Lebensjahr häufiger vor, vermutlich im Zusammenhang mit der allgemeinen Sklerose der Gefässe und Organe und mit den atrophischen Schäden in den Organen (prädisponierende Ursache).

4. Die Einschlüsse im Nebennierenmark wurden in folgenden Fällen angetroffen: akute bakterielle Erkrankungen (Bronchopneumonie, Pneumonie, Abszesse, Rippenfellentzündung, Septikämie) und chronische Bakterieninfektionen (allgemeine Tuberkulose Tuberkulose der Nebennieren), hämorrhagische Diathesen bei Viruskrankheiten (Grippe), allgemeine Epitheliomatose und dystrophische Fettleber.

5. In den meisten Fällen wird die Anwesenheit dieser Einschlüsse von Nebennierenschäden begleitet:

a) infiltrative, degenerative und hämorrhagische Schäden im Nebennierenmark;

b) grosse Lipoidmengen, selten degenerative und hämorrhagische Schäden in der Nebennierenrinde.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE PROTOPLASMIC INCLUSIONS IN THE ADRENAL MEDULLA IN MAN

SUMMARY

From a study of the protoplasmic inclusions in the adrenal medulla of human subjects (118 cases) the following conclusions may be drawn:

1. Protoplasmic inclusions were never found in the adrenal medulla of children (up to 12 years of age).

2. In adults, these inclusions were detected in 16 cases, more often in men than in women.

3. These inclusions are more frequently to be found after the age of 50, probably in connexion with the generalized sclerosis of the vessels and viscera and with atrophic lesions in the viscera (predisposing cause).

4. Inclusions in the adrenal medulla are to be found in cases of microbial disease, either acute (bronchopneumonia, pneumonia, abscesses, pleurisy, septicaemia) or chronic (generalized tuberculosis, tuberculosis of the adrenals), haemorrhagiparous viral disease (influenza), generalized epithelioma and fatty dystrophy of the liver.

5. In most cases the presence of these inclusions is accompanied by lesions in the adrenals:

a) infiltrative, degenerative, haemorrhagic lesions at the level of the medulla;

b) large amounts of lipoid, seldom degenerative and haemorrhagic lesions at the level of the cortex.

RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ ACTIVE DE L'HOMME DANS LA DYSENTERIE BACILLAIRE

NOTE I

par

G. Istrati

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 20 juin 1960 —

Les résultats peu satisfaisants obtenus par l'emploi des vaccins antidysentériques, proposés jusqu'à présent, mettent en discussion non-seulement la valeur immunogène de ces produits, mais aussi l'existence même de l'immunité antidysentérique.

Les discussions qui ont eu lieu à la Conférence du Présidium de l'Académie des Sciences médicales de l'U.R.S.S. en 1955 (1), sur le problème de la dysenterie, ont montré que la vaccination en masse n'est pas indiquée à cause de l'efficacité insuffisante des méthodes de vaccination contre la dysenterie bacillaire. Ces discussions ont abouti à la recommandation de réduire le volume des vaccinations, en limitant uniquement aux indices épidémiologiques et, en premier lieu, aux sujets les plus exposés à la contamination.

Certains auteurs mettent en doute le fait que même l'infection avec une *Shighella flexneri* de type sérologique déterminé, serait capable d'instituer chez l'homme, une résistance envers une nouvelle infection avec le type homologue. Troitski (2) relate que dans l'élevage de Suhumi tous les singes, qui ont fait la dysenterie spontanée avec *Sh. flexneri*, sont restés pendant longtemps porteurs de germes. Par réinfection expérimentale en doses massives avec les mêmes germes on n'a pas réussi à provoquer une nouvelle infection.

D'autres observations, parmi lesquelles celles de Higgins et coll. (3), ont montré que, dans certaines conditions naturelles d'infection massive, les anciens malades de dysenterie ont récidivé quelques mois après, le type bacillaire incriminé étant le même que celui isolé la première fois.

Les recherches expérimentales avec différents vaccins corpusculaires et des extraits variés de *Sh. flexneri* type 2a, entreprises par le service de Dysenterie de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » (4—9), ont demontré que la souris présente une certaine résistance envers maximum 1—1,5 DCL germes suspendus en solution à 0,85%. Par contre, les résultats obtenus par la vaccination des souris, dans les cas d'infection, avec des germes englobés dans la mucine (10) sont impressionants, c'est-à-dire que les souris vaccinées avec certaines préparations deviennent résistantes à 100, 1000 ou même des centaines de mille de DL_{50}. Cependant,

selon nos observations encore non-publiées, ces résultats ne donnent qu'une fausse impression sur la valeur des vaccins étudiés. La même chose se passe aussi pour le test indirect d'évaluation des vaccins, c'est-à-dire avec le titrage du pouvoir protecteur du sérum des animaux ou des hommes immunisés avec différentes préparations, lorsque l'on emploie une dose test avec un certain nombre de germes englobés dans la mucine. Par ce procédé on a montré qu'un ml de sérum pourrait neutraliser l'activité infectante de quelques dizaines ou centaines de DL_{50}, alors qu'en réalité 1 ml sérum ne neutralise que maximum 1—2 DCL de suspension en sérum physiologique.

Les expériences effectuées par TUMANIAN et coll. (11), qui ont vacciné des singes avec différentes préparations de *Sh. sonnei* et de « l'*immunogène* » par voie souscutanée ou orale, ont donné des résultats relativement peu satisfaisants. Tous les singes (vaccinés ou non-vaccinés) ont fait la maladie; cependant, la dysenterie des animaux vaccinés a été de plus courte durée, ainsi que l'élimination des germes.

En 1946, SHAUGHNESSY et coll. (12) ont expérimenté sur 53 volontaires, en les inoculant par voie souscutanée avec trois doses, totalisant 2,5 ml vaccin (4,8 milliards germes de *Sh. flexneri* 2a/ml, tués par chaleur ou par rayons UV). Comme témoins on a pris 30 autres volontaires. L'infection par voie orale a été effectuée avec deux souches, récemment isolées, appartenant à un même type sérologique. En premier lieu, on a déterminé la dose DL_{50} pour l'homme. Cette expérience a montré que les deux vaccins n'ont conféré aucune résistance aux vaccinés vu que le pourcentage de l'infection de ces derniers a été, même, un peu plus élevé (72—82%) que celui des témoins (63%). Les données ont démontré cependant, qu'un pourcentage d'environ 30% des hommes ont résisté à une dose très élevée de germes administrés par voie orale (2,5—10 milliards). Par conséquent, si nous admettons que la vaccination n'a aucune valeur immunisante, on est obligé de conclure que certains individus possèdent une résistance naturelle ou, ce qui est plus probable, une résistance acquise à la suite de dysenteries antérieures.

Étant donné que les vaccins corpusculaires inactivés ou les différents extraits de *Sh. flexneri* et *Sh. sonnei* administrés par voie parentérale ou orale à l'homme n'ont pas eu d'effet prophylactique appréciable, nous nous sommes proposés d'étudier la possibilité d'immuniser l'homme à l'aide de germes vivants apathogènes, administrés par voie orale.

Dans la présente étude, nous tâcherons, en premier lieu, d'éclaircir les problèmes suivants:

1. Si une souche à la fois pathogène pour le cobaye et l'homme, ayant perdu, par passages répétés sur gélose inclinée, sa pathogénité pour le cobaye, reste toujours pathogène pour l'homme.

2. Si les souches de bacilles dysentériques obtenues des selles des individus ayant ingéré une souche apathogène, recouvrent leur pathogénité pour l'œil du cobaye ou pour l'homme.

3. Si une souche de *Sh. flexneri*, conservée dans le laboratoire sur milieu Dorset, pendant 2 ans et qui a une action pathogène pour la conjonctive du cobaye est également pathogène pour l'homme, par administration orale.

4. Si un dysentérique peut acquérir la résistance envers cette maladie ou s'il la refait en cas d'infection expérimentale par voie orale.

Les résultats obtenus à la suite de nos recherches, montreront s'il est possible ntrevoir l'immunisation active antidysentérique anti-Flexner, par l'admini- ation orale de germes apathogènes vivants.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Les expériences ont été effectuées sur trois volontaires [1]), dont deux t eu 5 et respectivement 8 ans auparavant une dysenterie avec *Sh. flexneri* 2a.

2. La souche de *Sh. flexneri* 2a T—I pathogène pour la conjonctive de l'œil cobaye (test de SÉRENY: 100.000 germes déterminent la maladie chez un baye sur cinq et 500.000 germes chez cinq animaux sur cinq) (13, 14).

3. La souche de *Sh. flexneri* 2a T-XXX, devenue apathogène pour le cobaye a suite de 30 passages, effectués quotidiennement, sur gélose inclinée [2]). L'ab- nce de la pathogénité a été vérifiée sur 40 cobayes.

4. Neuf souches de *Sh. flexneri* 2a, apathogènes pour l'œil du cobaye, tenues de coprocultures positives, résultées après les premières 3 ingestions T-XXX. Les souches, mélangées en parties égales, totalisant 30 milliards rmes, ont représenté la culture vivante T-XXX-A.

5. Quatre souches apathogènes de *Sh. flexneri*, obtenues de coprocultures sitives à la suite de la 5-e injection, également mélangée, ont constitué la culture XXX-B.

6. La souche de collection *Sh. flexneri* 2a — *D. Sartorius*, apathogène pour il du cobaye.

7. Le milieu sélectif à bile sèche ISTRATI-MEITERT.

8. Le sérum poly-F, les sérums absorbés antigroupe B, et le sérum préparé sur lapin avec la souche *Sh. flexneri* 5 (G541), absorbée avec la souche *. flexneri* 5 *(G. Sartorius)*. La souche G541 contient un facteur antigénique plus, le facteur 10 (GOREA et MEITERT, 15). Ce facteur apparaît chez les souches i passent en phase C sous l'action des bactériophages, ainsi qu'il a été prouvé périmentalement (ISTRATI, MEITERT, CIUFECO, 16).

9. Cobayes de 250 à 350 g.

10. L'administration perorale des germes vivants: une culture de 18 heures 37°C sur gélose nutritive inclinée a été suspendue en 15 ml eau de robinet; nombre de germes par tube a été d'environ 30 milliards. L'ingestion a été faite jeun, 5 minutes après l'administration de 5 g bicarbonate de soude. Les volon- ires ont bu immédiatement après 50 ml eau de robinet; ils n'ont mangé que ux morceaux de pain une heure après ou un repas normal 4 heures après.

Le volontaire I.G. a reçu par voie buccale environ 30 milliards germes vivants athogènes — première et seconde ingestion à intervalle de 8 jours, les suivantes intervalle de 6 jours. Pour les trois premières ingestions on a administré la souche XXX, pour la 4-e et la 5-e — la culture T-XXX-A, pour la 6-e — T-XXX-B . le tableau I) et pour la 7-e ingestion la souche *D. Sartorius*. A un intervalle 6 jours à partir de la dernière ingestion de germes apathogènes, le volontaire

[1]) Nous adressons nos plus vifs remerciements aux personnes volontaires qui nous ont dé à l'occasion de cette étude.

[2]) Nous remercions le Dr. A. Gorea pour la souche T-XXX, qu'il a mise à notre sposition.

Tableau I

Tableau synoptique concernant l'expérience et les observations faites sur le volontaire I. G.

Souche Sh. flexneri administrée perorale	Nombre des ingestions et intervalle d'administration (en jours)	Coprocultures consécutives aux ingestions (en jours)	Rapport approximatif des colonies isolées des coprocultures		Nombre de colonies de Sh. flexneri 2a isolées en phase					Test de Sérény	Aspect des colonies de Sh. flexneri
			Sh. flex.	E. coli	A	B	B-C	C	D		
T—XXX	I-e	1	99	1	9					0	n
		2	10	90	9					0	n
		3	0,5 **)	99,5	16					0	n
		4 et plus	0	100 *)							
	8 jours										
	II-e	1	10	90	10	1				0	n
		2	5	95	11					0	n
		3 et plus	0	100							
	6 jours										
	III-e	1	15	85	10					0	n
		2	1	99	10					0	n
		3	1	99	10					0	n
		4	0,25	99,75	10					0	n
		5	0	100							
T—XXX—A	6 jours										
	IV-e	1	99	1	10					0	n
		2	2	98	10					0	n
		3	0,5	99,5	9					0	n
		4	0,25	99,25	2					0	n
		5	0	100							
	6 jours										
	V-e	1	15	85	15	3			2	0	iff
		2	10	90	2		2			0	if
		3	0,25	99,75	4					0	n
		4	0,25	99,75	1					0	n
		5	0	100							
T—XXX—B	6 jours										
	VI-e	1	99	1	10					0	if
		2	20	80	3			1	1	0	if
		3 et plus	0	100							
D Sartorius	6 jours										
	VII-e	1	50	50	11					0	n
		2 et plus	0	100							

LÉGENDE ET EXPLICATIONS:

* = 100... culture pure sur toute la boîte;
** = 0,25, 0,5, 1, 2, 5 etc. rapport approximatif de l'aspect numérique des colonies sur la boîte;
n = aspect normal des colonies;
iff = la majorité des colonies paraît infectée par le phage;
if = un peu plus de 50% des colonies paraît infecté par le phage.

été infecté par voie buccale avec 850.000 germes T-I pathogènes. Six jours rès, il a été réinfecté, par la même voie, avec 3,6 milliards germes de la même uche.

On a effectué des récoltes de sang: avant la première ingestion de germes athogènes et avant les autres 4 ingestions, avant l'infection avec la dose de 3,6 mil-rds germes T-I et 7 jours après cette dernière infection.

Après chaque ingestion, pendant 4—5 jours consécutifs, on a fait des copro-ltures (4—5 boîtes Petri, milieu ISTRATI-MEITERT — bile sèche). Les selles nt été suspendues en solution saline, dans les mêmes conditions afin d'obtenir dispersion parfaite des colonies. Pour l'orientation générale, le nombre de lonies de *Sh. flexneri* développées était apprécié selon que la boîte était mplètement ou partiellement couverte de colonies de bacilles dysentériques, ur fréquence étant rapportée au nombre des colonies de colibacilles.

RÉSULTATS

I. — Après les 7 ingestions de germes apathogènes l'état du volontaire I.G. mpérature et transit intestinal) est resté non-altéré.

Dans le tableau I sont exposées les administrations perorales de germes athogènes, avec l'indication des souches utilisées pour le volontaire I.G.

Analysant les données du tableau I, on observe:

A la suite des 3 ingestions de T-XXX se développent de nombreuses colonies *B. dysentériques*. Le lendemain de la 1-e ingestion ces colonies dépassent de aucoup le nombre des *colibacilles*. Les jours suivants, le nombre des colonies *B. dysentériques* est en régression prononcée, de sorte qu'on ne les décèle us le 4-e ou le 5-e jour; après la seconde ingestion, ils n'apparaissent plus, s même le 3-e jour. Le nombre de colonies de *colibacilles* revient très rapide-ent au taux normal. Le premier jour, suivant la 2-e la 3-e ingestion, le nombre s colonies de *Shigella* était de 7 à 10 fois plus réduit que celui du lendemain la première ingestion.

De nouvelles ingestions (la 4-e et la 6-e) représentées par les cultures XXX-A et T-XXX-B, administrées pour la première fois, déterminent le lendemain pparition dans les coprocultures de nombreuses colonies de *B. dysentériques* de rares colonies de *B. coli*. Pour le reste, les résultats sont pareils à ceux otenus avec la souche T-XXX.

Des 11 clones isolés des cultures positives, 24 heures après la seconde inges-on de T-XXX, on a mis en évidence un clone qui avait perdu l'antigène de type II, conservant que les antigènes 3,4 (variante Y), c'est-à-dire qu'il avait passé phase B. Ce fait reste isolé jusqu'à la 5-e ingestion, quand dans l'intestin du olontaire I.G. apparaît un bactériophage très actif envers la souche T-XXX, nsi qu'envers toutes les cultures de *Shigella* isolées des selles. En même temps n a isolé de l'intestin des variantes en phases B, C et D. Ces variantes proviennent nt des colonies à aspect morphologique normal, que des colonies apparemment fectées par le phage. Nous avons considéré comme variantes en phase C, celles ui, tout en perdant les antigènes II et 3, 4, ont acquis l'antigène 10. Ce dernier trouve aussi chez les variantes en phase B, que nous avons désignées comme s variantes de phase B-C. On a également observé l'apparition de variantes ui avaient perdu l'antigène de type et l'antigène de groupe 3, 4, mais étaient

dépourvues de l'antigène 10; nous avons considéré ces formes comme variantes de phase D.

Toutes les cultures isolées à partir des coprocultures à la suite de l'ingestion de *Sh. flexneri* apathogènes (T-XXX et *D. Sartorius*) ont donné le test de SÉRENY négatif. Ces souches (T-XXX-A et T-XXX-B) administrées « per os » au volontaire I.G. n'ont provoqué aucun trouble, ce qui prouve que les souches apathogènes repassées par l'intestin de l'homme, même en dose de 30 milliards germes, ne redeviennent pas plus pathogènes pour le cobaye que pour l'homme.

Six jours après la dernière administration orale de germes vivants apathogènes, le volontaire I.G. a ingéré 850.000 germes vivants pathogènes (T-I). Les jours suivants, la température, l'état général et le transit intestinal sont restés normaux. On n'a décelé aucune colonie de *B. dysentériques* dans les coprocultures pratiquées pendant 5 jours de suite.

Après un autre intervalle de 6 jours, le volontaire a de nouveau été infecté, cette fois avec 3,6 milliards germes pathogènes (T-I). Le tableau clinique, consécutif à l'ingestion, a été le suivant:

— après 6 heures — gargouillements et tension abdominale, fièvre, la température s'élevant progressivement jusqu'à 39,9°C;

— après 14 heures — frissons s'accentuant progressivement, pendant 3 heures, et cédant par la suite;

— après 17 heures — première selle liquide et vomissements, suivis de quelques autres selles liquides avec mucus et stries de sang. Les frissons ont cédé presque immédiatement après la première selle et les premiers vomissements.

En résumé, l'aspect clinique a revêtu plutôt la forme d'une toxi-infection alimentaire, que celle d'une infection dysentérique classique;

— après 22 heures — à la suite de l'administration de 2 g de chloramphénicol (antibiotique auquel la souche était très sensible), la température a diminué progressivement, pour atteindre 36,8°C, 32 heures après l'ingestion infectante;

— après 3 jours, pendant lesquels le malade a reçu 4 g de chloramphénicol le tableau clinique revient au normal.

A partir de la première selle aqueuse se sont développées nombre de colonies de *B. dysentériques*, ainsi que de très nombreuses colonies de *colibacilles*. De la 2-e selle liquide muco-sanguinolente se sont développées abondamment et presque uniquement des colonies de *B. dysentériques*. Des vomissements on n'a isolé aucune colonie microbienne. Après le traitement, les ensemencements effectués pour les *B. dysentériques*, ont été négatifs.

Les sérums récoltés avant la première ingestion de germes pathogènes, pendant la maladie et 7 jours après l'infection avec 3,6 milliards germes pathogènes n'ont présenté aucune variation du titre agglutinant (antigènes T-I et T-XXX), ou hémagglutinant (hématies sensibilisées par un extrait de T-XXX à 100°C).

II. — Le jour même où le volontaire I.G. a été infecté avec 850.000 germes pathogènes, le volontaire G.A. a ingéré le même nombre de germes pathogènes. Les jours suivant l'infection, la température a été normale et l'appareil gastro-intestinal n'a présenté aucun trouble. Une seule colonie de *B. dysentériques* — pathogènes pour l'œil du cobaye — a pu être isolée deux jours après l'ingestion des germes pathogènes.

A remarquer, que le volontaire G. A. avait souffert d'une dysenterie de type ı, 5 ans auparavant.

III. — L'absence de pathogénité pour l'homme de la souche T-XXX a égale-ent été démontrée sur un 3-e volontaire (C.C) chez lequel, à la suite de l'adminis-ation de très fortes doses répétées (30 milliards), n'est apparue aucune manifes-tion pathologique. Après la première, aussi bien qu'après la seconde ingestion, sont développées de nombreuses colonies de *B. dysentériques* (99% et respec-vement 50% par rapport aux colonies de *colibacilles*).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les recherches effectuées ont permis, en quelque mesure, de répondre ux problèmes que nous nous sommes posés:

1. L'ingestion de germes apathogènes vivants (T-XXX et *D. Sartorius*) érato-conjonctivito-négatifs, ne produisent pas de phénomènes d'ordre local u général chez l'homme. Il ressort donc, que le test de SÉRENY représente un oyen précieux pour vérifier la pathogénité ou l'apathogénité des germes du roupe *Shigella* chez l'homme.

2. Les bacilles dysentériques, isolés des coprocultures à la suite de l'ingestion e germes apathogènes, n'ont déterminé dans aucun des cas une kérato-conjonc-vite chez les cobayes; de même, administrés « per os » à l'homme, ils n'ont roduit aucun trouble, ni local ni général. Il paraît donc, que le passage par intestin de l'homme des souches apathogènes pour le cobaye, ne détermine as une réversion du caractère de la pathogénité.

3. La dose d'environ 1 million germes pathogènes vivants administrés ar voie orale aux deux sujets qui ont eu une dysenterie du même type sérologique à 8 ans auparavant et dont un a été par la suite vacciné par voie orale avec des ermes apathogènes, ne détermine aucun trouble local ou général. Ces résultats ous ont décidés à utiliser pour l'infection une dose encore plus massive (3,6 mil-ards germes), qui, ainsi que nous l'avons vu, a déterminé une maladie de type oxi-infection alimentaire. Ce fait prouve qu'une souche maintenue pendant eux années sur milieu Dorset et qui a conservé sa pathogénité pour l'œil de cobaye, st également pathogène pour l'homme.

4. En conditions naturelles il est exceptionnellement rare qu'une infection e produise avec des doses dépassant un million germes (cette dose étant probable-ent beaucoup plus petite). En pareil cas, l'infection prend l'aspect d'une oxi-infection alimentaire, ainsi que nous l'avons personnellement observé pen-lant une épidémie de dysenterie alimentaire (17). En effet, il est difficile d'ima-iner qu'un ancien malade de dysenterie ou un sujet vacciné (même récem-ent) puisse résister à une infection orale avec plusieurs milliards de germes patho-ènes. La barrière intestinale, renforcée par une immunisation active, possède n certain degré de résistance, qui peut être dépassé en cas exceptionnel, ainsi u'il est advenu dans le cas du volontaire G.I.

5. Dans une étude, en cours de publication (16), nous avons démontré expé-imentalement la possibilité de la variation antigénique de la *Shigella flexneri* a sous l'action des bactériophages spécifiques.

Dans le présent travail, nous avons eu l'occasion de constater que sous l'action du phage de telles variantes apparaissent (B, C, D), ce que nous avions d'ailleurs déjà entrevu dans l'étude mentionnée (16). Nous nous croyons autorisés à affirmer que certains facteurs écologiques de l'intestin et, en premier lieu les bactériophages entériques, sont capables de déterminer des variantes qui ne peuvent être diagnostiquées à l'aide des sérums agglutinants dont on dispose à présent.

6. Le nombre insuffisant de volontaires dont nous avons disposé n'a pas permis des conclusions satisfaisantes sur la valeur immunisante des germes apathogènes vivants, administrés par voie orale. Seules des expériences sur un plus grand nombre de volontaires pourront prouver si les germes apathogènes vivants, qui sont complètement inoffensifs et bien tolérés, peuvent servir dans la vaccination préventive de l'homme. Le test épidémiologique seul pourra nous donner une réponse définitive à ce problème.

BIBLIOGRAPHIE

1. Décision de la conférence dans le problème de la dysenterie. Présidium de l'Académie des Sciences Médicales U.R.S.S. — 17—19 janvier 1955. Rev. de Microbiologie, Epidemiologie şi Immunologie, 1955, No. 7, 183. (Revue Soviétique traduite en roumain).
2. Troitski I. V. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 6, 32.
3. Higgins A. C. et coll. — Amer. J. Trop. Med., 1955, **4,** 281.
4. Gorea A., Istrati G. et Maldaresco I. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 358.
5. Istrati G., Gorea A. et Maldaresco I. — Arch Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 368.
6. Istrati G., Gorea A. et Maldaresco I. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 575.
7. Barber C., Istrati M., Soru E., Gorea A. et Istrati G. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 123.
8. Weinbach R., Istrati G., Gorea A. et Maldaresco I. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 133.
9. Istrati G., Gorea A., Barber C., Istrati M. et Soru E. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 205.
10. Rauss K. et Ketyi I. — Orvósi Hétilap 1956, No. 6, 141.
11. Tumanian M. A. et coll. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 9, 119.
12. Shaughnessy H. et. coll.: J. Amer. Med. Assoc., 1946, **132,** 362.
13. Séreny B. — Acta Microb. Acad. Scient. Hung., 1955, **2,** 293.
14. Séreny B. — Acta Microb. Acad. Scient. Hung., 1957, **4,** 367.
15. Gorea A. et Meitert T. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, sous presse
16. Istrati G., Meitert T. et Ciufeco C. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1961. **20,** 87.
17. Istrati G. et Meitert T. — Travaux de la Sess. Scient. de l'Inst. « Dr. I. Cantacuzino » 1955, 110.

ИММУНИТЕТ ПРИ БАКТЕРИЙНОЙ ДИЗЕНТЕРИИ У ЛЮДЕЙ

СООБЩЕНИЕ I-ое

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Исследования проведенные на небольшом количестве добровольцев показывают следующее:

Поглощение живых, непатогенных (кератоконъюнктивит-отрицательных) микробов не вызвало местных или общих патологических явлений у людей. Таким образом

тест Серени является повидимому ценным способом для установления патогенности или отсутствия патогенности для человека, микробов из группы шигел.

Дизентерийные палочки, изолированные из копрокультур после поглощения непатогенных микробов, не вызвали ни в одном случае кератоконъюнктивита у морских свинок, причем у людей пероральное введение также не вызвало местных или общих патологических явлений. Таким образом проход штаммов апатогенных для морских свинок через кишечник человека, не вызывает повидимому обратимости признака патогенности.

Штамм *Sh. flexneri* 2a (T-1) патогенный для глаза морской свинки (сохраненный в лаборатории на среде Дорсе в течение около 2 лет) вводимый пероральным путем, в дозе содержающей около миллиона микробных тел, не вызывает заболевания у переболевших дизентерией или у привитых пероральным путем.

Тот же самый штамм *Sh. flexneri* 2a, вводимый перорально в дозе содержащей 3,6 миллиардов микробов, вызывает заболевание подобное токсико-инфекции, добровольцу привитому перорально 7-ю дозами в 30 миллиардов непатогенных микробов каждая.

Количество в 3,6 миллиардов патогенных микробов считают слишком большим для того, чтобы быть задержанным у кишечного барьера, даже если последний хорошо иммунизирован.

В течении данных исследований удалось также случайно выявить появление антигенных вариантов фазы B, C и D под влиянием наличия фагов в кишечнике.

Предложено продолжение исследований в дальнейшем, на большем количестве добровольцев в целях определения свойств вакцины данного типа в зависимости от эпидемиологического испытания.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE IMMUNITÄT DES MENSCHEN BEI BAZILLENRUHR. — I. MITTEILUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Die bei einer beschränkten Anzahl von Freiwilligen durchgeführten Untersuchungen ergaben folgendes:

Durch den Mund eingenommene lebende, nicht-pathogene (keine Keratokonjunktivitis erzeugende) Keime (T-XXX und *D. Sartorius)* riefen bei Menschen weder örtliche noch allgemeine pathologische Erscheinungen hervor. SÉRENYS Test scheint also ein wertvolles Mittel zur Feststellung der Pathogenität oder Apathogenität der Keime der *Shigella*-Gruppe beim Menschen zu sein.

Die, nach der Einnahme von nicht-pathogenen Keimen, aus dem Stuhl isolierten Dysenteriebazillen erzeugten beim Meerschweinchen niemals eine Keratokonjunktivitis und riefen auch beim Menschen, nach peroraler Verabreichung, keine örtlichen oder allgemeinen pathologischen Erscheinungen hervor. Der Durchgang für das Meerschweinchen nicht-pathogener Stämme durch den menschlichen Darm scheint also kein Umschlagen der Pathogenitätsmerkmale zu veranlassen.

Der für das Auge des Meerschweinchens pathogene Stamm *Sh. flexneri* 2a (T-I) rief (nach fast 2 Jahre lange Aufbewahrung auf DORSET-Nährboden im Laboratorium) bei peroraler Verabreichung in Dosen von etwa einer Million, an gewesene Dysenteriekranken oder *per os* geimpften Personen, keine Erkrankung hervor.

Der gleiche Stamm *Sh. flexneri* 2a rief bei peroraler Verabreichung in einer Dosis von 3,5 Milliarden Keimen an einem 7 mal mit Dosen von je 30 Milliarden nicht-pathogenen Keimen peroral immunisierten Freiwilligen eine Erkrankung toxisch-infektiöser Art hervor.

Die Menge von 3,6 Milliarden pathogenen Keimen wird als zu groß angesehen, um selbst die gut immunisierte Darmwand nicht durchdringen zu können.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde auch zufällig festgestellt, daß unter der Einwirkung von Phagen im Darm, antigenische Phasenvarianten B, C und D auftraten.

Es wird der Vorschlag gemacht, die Arbeit an einer größeren Zahl von Freiwilligen fortzusetzen, um den Wert eines derartigen Impfstoffes in der epidemiologischen Probe bestimmen zu können.

INVESTIGATIONS CONCERNING IMMUNITY IN HUMAN BACILLARY DYSENTERIA. 1-st Note.

SUMMARY

Investigations carried out in a small number of volunteers resulted in the following findings.

The investigation of live non-pathogenic germs (negative in the keratoconjunctivitis test T-XXX and *D. Sartorius)* did not cause any local or systemic pathological changes in humans. SÉRENY's test thus appears to be a valuable means of stating the pathogenicity or non-pathogenicity of germs of the *Shigella* group for the human subject.

The dysenteria bacilli isolated from the stools after ingestion of non-pathogenic germs never induced keratoconjunctivitis in the guinea-pig nor did they cause local or systemic pathological changes following their oral administration in humans. Hence, the passage of strains which are non-pathogenic for guinea-pigs through the human intestine does not appear to cause the reappearance of pathogenicity.

When administered *per os* in doses of about one million germs, the strain *Sh. flexneri* 2 a (T—I) (maintained in the laboratory on DORSET's medium for about two years), which is pathogenic for the eye of the guinea-pig, did not induce the disease in former dysenteria patients or in subjects immunized by the oral route.

The same strain of *Sh. flexneri* 2 a, when administered *per os* in a dosis of 3.6 milliard germs, induced a toxi-infectious disease in a volunteer who had been immunized by the oral route with 7 doses of 30 milliard non-pathogenic germs each. The amount of 3.6 milliard pathogenic germs is considered to be so large that it cannot be prevented from penetrating through the intestinal wall, even when the latter has been solidly immunized.

The demonstration of B, C, and D antigenic phase variants appearing under the influence of intestinal phages was a casual finding made in the course of the same investigations.

It is suggested to extend the investigations in a larger number of volunteers, with a view to determining the efficiency of vaccine of this type by means of the epidemiological test.

LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES ANAÉROBIES DU GENRE CLOSTRIDIUM, DÉTERMINÉE « IN VITRO » PAR DIFFUSION CIRCULAIRE EN GÉLOSE

par

J. Bittner, Viorica Voinesco et S. Antohi

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)

— Manuscrit reçu le 29 juillet 1960 —

Les recherches « in vitro » sur la sensibilité aux antibiotiques des anaérobies ont relativement limitées, fait expliqué par les difficultés techniques présentées par ces déterminations.

Dans la littérature, on trouve différentes méthodes appliquées dans ce domaine;

— la méthode des dilutions en milieu liquide (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11);

— la méthode des dilutions, combinée à la réduction du vert janus (12, 13, 14);

— la méthode de la diffusion en gélose sur boîtes Petri, incubées dans des conditions d'anaérobiose (15);

— une méthode utilisant le procédé de Fortner (16);

— la méthode de la diffusion verticale entre deux couches de gélose ensemencée (17, 18).

En 1952, l'un des auteurs (19) a utilisé pour la détermination de la sensibilité de certains anaérobies à la pénicilline, streptomycine et sulfathiazol, une méthode plus simple de diffusion circulaire. A cette époque nous n'étions pas encore au courant du fait que Chabbert (20) avait décrit quelques mois auparavant une méthode semblable, qui diffère cependant de la notre par quelques détails de technique.

Etant donné — à notre connaissance — que la méthode de Chabbert n'a plus été appliquée par la suite et qu'à présent il n'existe qu'un nombre restreint d'études d'ensemble sur la sensibilité aux antibiotiques des germes anaérobies, nous avons considéré nécessaire d'entreprendre une telle étude, utilisant la méthode décrite par nous en 1952.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Souches utilisées*: on a étudié 62 souches, appartenant à 13 espèces de germes anaérobies, du genre *Clostridium*:

— *Cl. perfringens* type A (8 souches de collection et 5 souches provenant d'infections « post-abortum » mortelles humaines);

— *Cl. perfringens* type B, C, D, E, F, (5 souches de collection — une pour chaque type);
— *Cl. tetani* (22 souches de collection);
— *Cl. oedematiens* (5 souches de collection);
— *Cl. septicum* (5 souches de collection);
— *Cl. histolyticum* (4 souches de collection);
— *Cl. fallax*, *Cl. cochlearium*, *Cl. chauvoei*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sporogenes*, *Cl. sordellii*, *Cl. gigas*, et *Cl. tertium* (8 souches de collection — une de chaque espèce).

2. *Antibiotiques*: on a utilisé:

a) des solutions d'antibiotiques préparées par nous, déposées sur des rondelles de papier filtre, comme suit: pénicilline — 1 U.I., streptomycine — 5γ, auréomycine — 5γ, tétracycline — 5γ, érythromycine — 5γ, tyrocidine — 5γ, tyrothricine — 5γ, bacitracine — 2U., nitrofuran — 5γ, polymyxine B — 5γ, magnamycine — 5 γ; *.

b) des rondelles sèches avec antibiotiques et sulfamides, préparées en Hongrie: pénicilline — 30 U.I., streptomycine — 30γ, auréomycine — 30γ, chloramphénicol — 30γ, néomycine — 100γ, terramycine — 30γ, polymyxine — 15γ, érythromycine — 10γ, tétracycline — 30γ, salvoseptil — 400γ, superseptil — 400γ ** pour chaque rondelle.

c) Enfin, des tablettes d'antibiotiques mises à notre disposition par la Comité d'Organisation du Symposium: «Les indications et les limites de la chimiothérapie anti-infectieuse» de Bucarest, dont l'emploi s'est montré difficile selon notre méthode et n'ont été utilisées que pour quelques déterminations.

3. *Milieu de culture*: gélose V.F. 2% avec 0,6‰ acide thioglycolique. En préalable, on a fait des déterminations, qui nous ont permis de constater que l'introduction de l'acide thioglycolique dans le milieu ne modifie pas la zone d'inhibition, mais permet, par contre, le développement régulier même des anaérobies les plus exigeants.

Pour l'ensemencement on a utilisé des cultures de 18 heures, incubées à 37°, sur bouillon V. F. — œuf, sous huile de vaseline.

4. *La technique* employée a été celle exposée dans notre travail antérieur (19), à savoir: sur la face intérieure du couvercle de la boîte de Petri on applique les rondelles de papier filtre (5 mm ⌀) sur lesquelles on dépose avec une anse (2 mm ⌀ intérieur) une goutte calibrée d'antibiotique. On dépose ensuite sur chaque rondelle de papier filtre, afin de la fixer, à l'aide d'une pipette Pasteur, 2—3 gouttes de gélose — fondue et régénérée et qui vient d'être ensemencée en proportion de 0,5 ml pour 50 ml gélose, pour une boîte de 15 cm ⌀ (pour les *Cl. oedematiens*, *Cl. gigas*, et *Cl. septicum* on utilise 1 à 2 ml culture d'ensemencement) — et puis on coule le reste de la gélose et on applique dessus le fond de la boîte.

Suit l'incubation — sans appareil de vide — à 37°; lecture après 18 et 36 heures afin d'observer les éventuelles colonies résistantes.

* Nous présentons nos remerciements au Prof. Dr. A. P. Ciucă, Directeur adjoint de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », qui a eu la bonté de mettre ces antibiotiques à notre disposition.

** Nous exprimons nos remerciements au Dr. R. Backhausz, Directeur adjoint de l'Intitut « Human » de Budapest, pour les rondelles sèches, gracieusement envoyées, utilisées dans le présent travail.

En ce qui concerne les rondelles sèches, la technique est identique, auf qu'on ne dépose pas de gouttes d'antibiotique, l'opération n'étant plus nécessaire.

RÉSULTATS

La technique décrite permet d'obtenir avec régularité des zones circulaires l'inhibition, pour tous les anaérobies étudiés.

Toutes les antibiogrammes ont été répétées 3 à 5 fois, effectuant en tout plus de 5000 déterminations. Les variations des diamètres des zones d'inhibition, observées lors des répétitions n'ont pas dépassé en général 10 à 20%.

Les variations n'ont pas été plus marquées par la méthode des disques humides que par celle des disques secs, ce qui prouve l'uniformité de la technique proposée par nous.

Les différences entre la lecture de 18 et celle de 36 heures ont été pratiquement inexistentes en ce qui concerne la zone totale (inclusivement les colonies résistantes secondaires).

Les chiffres moyens des déterminations effectuées sont synthétisés dans le tableau I.

Il résulte des données présentées:

1. *Antibiotiques d'élection.* La pénicilline a donné, sans exception, les meilleurs résultats pour toutes les espèces et pour toutes les souches étudiées.

Les différences entre la réponse aux deux doses utilisées (1 U.I. et 30 U.I.) ont été, en général, minimes ou inexistentes. D'autre part, plus une espèce est sensible aux antibiotiques en général, plus elle est sensible à la pénicilline (*Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl. gigas*, *Cl. septicum*).

La souche de *Cl. perfringens* No. 555, isolée par nous quelques mois auparavant d'un cas léthal d'infection « post-abortum », traité antérieurement à la pénicilline et streptomycine, s'est avérée résistante à la pénicilline au moment même de l'isolement, pour revenir à la sensibilité normale après le premier passage sur milieu de culture.

Les données obtenues paraissent démontrer que le problème de la résistance acquise envers la pénicilline — si important pour les autres genres — serait pour le moment, du moins, inexistant pour le genre *Clostridium*.

Il ressort du tableau I que le groupe des tétracyclines, le chloramphénicol et l'érythromycine sont efficaces vis-à-vis de toutes les espèces, se situant tous à peu près au même niveau, c'est-à-dire immédiatement après la pénicilline. La bacitracine est presque tout aussi active pour toutes les souches testées, à l'exception du *Cl. tetani*, du *Cl. histolyticum* et de quelques autres espèces. La magnamycine a une action modérée sur le *Cl. perfringens* et une action plus marquée vis-à-vis des autres espèces.

Le nitrofuran, la néomycine, la streptomycine, la polymyxine, la gramicidine, la tyrocidine, la tyrothricine peuvent être considérés comme pratiquement inactifs, exception faite pour les 5 souches de *Cl. oedematiens* et 4 des 5 souches de *Cl. septicum*, qui en présence de la néomycine ont donné des zones de sensibilité.

Les variations observées chez les différentes souches d'une même espèce sont en général minimes ou inexistentes pour les principaux antibiotiques ce qui

plaide encore pour l'idée qu'il n'existe pas de résistance acquise par voie naturelle dans le genre *Clostridium*, vis-à-vis des antibiotiques.

Expérimentalement, on a pu constater que par repiquage d'une colonie secondaire, provenant d'une aire d'inhibition à la bacitracine de la souche de *Cl. oedematiens* No. 79, on a obtenu une variante totalement résistante à la bacitracine, avec des modifications du caractère de la croissance et qui avait perdu la plus grande partie de son pouvoir toxigène (Fig. 1).

Les deux sulfamides — salvoseptil et superseptil — constituent une exception. En présence de ces agents on peut constater une différence marquée entre les diverses souches de la même espèce *(Cl. perfringens)*, tandis que toutes les souches de *Cl. septicum* ainsi que le *Cl. sordellii* et le *Cl. tertium* sont sensibles. Il est intéressant de souligner que dans presque tous les cas la sensibilité est commune aux deux sulfamides et qu'elle peut être très prononcée (la souche de *Cl. perfringens* B.P_6K).

2. *Différences entre les espèces du genre Clostridium.* Si l'ordre d'activité des antibiotiques principaux reste en général pareil pour toutes les espèces étudiées, on peut, par contre, constater une différence d'activité globale entre les espèces. Ainsi, il existe des espèces qui sont nettement plus sensibles à la majorité des antibiotiques, que d'autres. L'espèce la plus sensible est le *Cl. oedematiens*, suivant par ordre: le *Cl. tetani*, le *Cl. gigas*, le *Cl. septicum*, le *Cl. perfringens* étant le moins sensible; les autres espèces occupent une situation intermédiaire. A première vue, on pourrait supposer que la sensibilité est en accord avec la toxicité et la pathogénité des espèces. Ainsi, le *Cl. oedematiens* et le *Cl. tetani* sont — à part le *Cl. botulinum* — les espèces clostridiennes les plus toxigènes et le *Cl. septicum* l'espèce qui possède la plus forte virulence. Plus encore, la souche la plus toxigène de *Cl. perfringens* des 18 souches étudiées, la souche B.P_6 K. est la plus sensible à la majorité des antibiotiques et des sulfamides. Des observations du même ordre, ont été faites par de FAGONDE (13); toutefois selon cet auteur, certaines espèces non-pathogènes présentent également une sensibilité assez nette, comme par exemple le *Cl. sporogenes*, ce qui ressort d'ailleurs aussi de notre étude.

Nous considérons plutôt que le degré de sensibilité est en rapport avec le degré d'anaérobiose de l'espèce respective, étant donné que l'ordre de la sensibilité diminue presque parallèlement avec les exigeances d'anaérobiose des différentes espèces. Soulignons que des différences apparaissent aussi dans le cas où le degré de croissance est d'intensité égale chez les deux espèces comparées. (Fig. 2).

3. *Aire d'antibiose (inhibition).* L'aire d'antibiose se forme à différentes périodes en fonction du rythme de croissance de l'espèce respective. Chez le *Cl. perfringens*, le *Cl. histolyticum* et le *Cl. sporogenes* elle apparaît après 3—4 heures, permettant d'effectuer, dans cet intervalle, un antibiogramme complet. Chez les autres espèces, elle se forme après 10—18 heures, ne se modifiant point — ainsi que nous l'avons déjà montré — en ce qui concerne le diamètre total, au cours des 24 heures suivantes. Cependant, on peut observer une série de modifications à la marge de la zone d'inhibition, qui peut présenter un des aspects suivants:

a) Délimitation nette vis-à-vis de la zone de croissance microbienne (Fig. 3).

b) Délimitation peu claire, zone « floue » de passage entre l'aire d'inhibition et celle du développement microbien (Fig. 4).

Sensibilité aux antibiotiques des anaérobies du genre Clostridium (Données moyennes, 3 — 5 déterminations)

Tableau I

Souches microbiennes	Pénicilline		Auréomycine		Chloramphénicol		Terramycine		Tétracycline		Erythromycine		Bacitracine	Magnamycine	Salvoseptil	Superseptil	Nitrofuran	Néomycine	Streptomycine		Polymyxine		Gramicidine	Tyrocidine	Tyrothricine
	R.h	R.s.	R.h.	R.s.	R.h.	R.s.	R.h.	R.s.	R.h.	R.s.	R.h	R.s.	R.h	R.h	R.	R.	R.h.	R.s.	R.h.	R.s.	R.h.	R.s.	R.h.	R.h	R.h
	I U.I.	30 U I	5 γ	30 γ	5 γ	30 γ	5 γ	30 γ	5 γ	30 γ	5 γ	10 γ	2U	5 γ	400 γ	400 γ	5 γ	100 γ	5 γ	30 γ	5 γ	15 γ	5 γ	5 γ	5 γ
1 Cl. Perfringens 1938 Type A	25	27	21,3	25	19,3	21,8	12,6	22,2	21	23,8	20	24,4	19,3	14,3			11								
2 Leehien	24,3	25,2	21,6	22,4	17,3	20,2	14,6	21	20,6	23,6	19	23	19,6	16	9,8	—	-	—	—	—	—	—	—	8	—
3 JJ	25,3	24,8	22	22,6	16,6	22,2	13	22,4	21,3	23,6	20,3	23,4	18	8,6	—	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 » » Wellcome » »	25,3	29	19	23,8	15,3	22,2	14,3	21,8	19,6	23,4	19,3	23,4	21,3	15,3	—	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 » » S.R. 12 » »	24	26,6	20	23,6	12	22,4	15,3	21,8	21	23	22,2	23	18,6	15,5	23,2	22,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 » » B.P$_6$.K. » »	29,6	30	22	24	17,3	24,4	14,6	24	21,6	26,8	19,6	22,4	23	14	27	27,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 » » Prague » »	25	25,8	22	21,8	15	20,4	12,6	23,6	19,6	23,6	17,3	23,6	19,6	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8 » » Budapest -	26,3	26,2	21	23,5	16,6	24,2	13	22,8	20,3	22	21,6	24,2	22,3	13,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9 » » 555 » »	25,6	28	22,6	27,6	16	23,3	8	25,6	21	25,3	19	22,6	19,3	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 » » Rin » »	28	30,3	20	29,3	14,6	25,3	10	28,6	18,3	27	19	24,3	17,3	13,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 » » Bacău » »	25,6	31,3	20,6	34	15	28,3	12,6	28,3	21,6	30,6	19,3	26,3	18	11,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 » » 55 H. » »	24,6	27	19,3	26,3	14	20,3	—	24,3	16,3	25,3	16,6	22	18	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13 » » Catinca » »	25	29	18,6	27,3	14,3	29,3	10	27,3	19,6	28	18	23	19,3	13,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14 » » » B.	24	27,2	20,3	24	13,6	22	17	24,8	19,6	26,4	17,6	23	21,6	12,6	25,8	9,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15 » » » C.	25,3	26,6	23	22	17	22	16	21,8	20,6	22,8	19,3	23,4	17	15	—	—	—	9,3	—	—	—	—	—	—	—
16 » » » D.	25	25,6	22,6	23,6	14,3	22,4	13,3	24,8	19,3	23,6	18	22,2	20	14,3	25,4	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17 » » » E.	25,6	25,8	21,6	22,0	18,6	23,2	15,6	23,0	21	22,2	18,3	23,4	21,6	14,5	14,4	8,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18 » » » F.	24,3	25,2	19,6	23,2	15,6	21,6	13	22,2	19	21,2	18,6	21,4	20	15,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19 Cl. tetani Weissensee	42	46,3	25,3	37	30,5	35	14,6	35	28	34	31,3	36,3	—	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20 » » Prague	45,6	46	31,6	38,3	27,6	35,3	20	38,6	26,3	38,3	33	38,3	—	24,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21 » » Nr. 2	36	44,3	26,6	33	28,6	38	21,3	36,6	25	36,3	29,3	37,3	—	23,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22 » » » 4	47,3	47	30	38,3	30	38	18	40	31,6	39,3	33	38,3	-	23,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23 » » » 21	41	45,6	27,3	36	23,3	38,6	—	31,6	29,3	32,6	33	33,3	—	22,6	—	—	—	9,6	—	10	—	—	—	—	—
24 » » » 25	40	46	15,6	26	16,6	30	—	26,6	12,3	26,6	17,3	26,6	—	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25 » » » 36	41,6	47,6	27	38,3	23,3	39,3	14,6	37	23,6	38	30	38,3	—	20,6	—	—	—	—	—	11,3	—	—	—	—	—
26 » » » 40	43,6	48,3	24	32,6	29	35,3	14,6	35,6	27	35	34	37,6	—	25,3	—	—	12	—	—	—	—	—	—	—	—
27 » » » 47	46	48,3	26,6	32,6	26,3	34	18,3	34	31	34,6	33	35,6	—	23,3	—	—	—	8,6	—	—	—	—	—	—	—
28 » » » 47 D.	39,6	37,6	28,3	29,3	24	27,6	16	27,6	27,3	30	29,3	30	—	21,6	—	—	12,6	—	—	—	—	—	—	—	—
29 » » » 81	48,3	×	30,3	×	31,6	×	17,6	×	29,6	×	35	×	—	24,3	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30 » » » 86	45	×	27,6	×	25,6	×	13,3	×	26,6	×	32,6	×	—	20	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
31 » » » 89	41,6	×	28	×	24,3	×	15,3	×	27,3	×	32,6	×	-	22,3	×	×	10,6	—	—	—	—	—	—	—	—
32 » » » 91	43,3	×	32,6	×	22	×	16,3	×	27,6	×	32,3	×	—	22	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33 » » » 92	39,3	×	28,6	×	26,3	×	12,6	×	28,6	×	33	×	—	24,3	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34 » » » 94	38	×	28,3	×	27,3	×	15	×	28,6	×	33	×	—	16,6	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35 » » » 85	40	×	28,3	×	26,6	×	17	×	26	×	31,6	×	—	23,3	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36 » » » 103	39,3	×	26,6	×	24,6	×	17,3	×	26,6	×	30,6	×	—	22,6	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37 » » » 105	37,6	×	29,6	×	27,3	×	15	×	29,6	×	34,3	×	—	20,6	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38 » » » 154	38,3	×	29	×	22,5	×	12	×	28	×	32,3	×	—	20	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39 » » » 78	38,6	×	24,3	×	23,3	×	13,3	×	24,3	×	30	×	—	23,3	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40 » » » 38	33,6	×	27	×	21,3	×	—	×	26,6	×	29	×	—	21	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
41 Cl. oedematiens B.P. 1	42	43	30	33	31,6	33	17,6	34,3	29,6	36,3	34,3	36,3	29	24,3				23,6				11	12	11	
42 nr. 277	49	48,3	30,6	35,3	24,6	36,3	16	35	29,3	37,3	33,6	40,2	27,3	21,3				18				7	8,6	8	
43 » » 79	51,3	46,6	33,6	36,6	27	38	20,3	36	31,6	37,3	36,3	40,3	30,3	28			10,6	17,6				13,3	11	11,3	
44 Eanor	52,6	47,3	36,6	36	30,6	37	20,6	37	36,3	37	41,6	39,3	35	27,6				16,6				9	9,3	9	
45 1938	51,3	46	30	34,3	30,6	32,3	22,6	35,3	29	36,6	35,6	37,6	29,3	26			7,6	19				12,6	8,3	8,3	7,6
46 Cl. histolyticum nr. 5	30,6	34,3	21,3	33,3	16,3	30,3	—	29	18	29,6	25,6	29,6	—	19,6	—	—	—	—	—	15	—	—	8,3	8	8
47 » » D. 16	29	29,6	23	29,3	19	30	13	29,3	22	29,3	23	29	7	20	—	—	—	—	—	12,6	—	—	—	—	—
48 » » Chevaux	33	34	22,3	30,7	19	29	13,6	34	23,6	31,2	28	32	—	22	—	—	—	11	—	10,7	—	—	—	—	—
49 » » nr. 503	30,6	31,6	24	29,3	21	28	14	32,6	24	33,3	27,3	32	9,6	21	—	-	—	7,3	—	—	—	—	—	—	—
50 Cl. Septicum Budapest 54	35	30,3	30,6	32,3	26,6	29,3	14,6	36	27,6	34	29,6	32,6	18,6	16,3	10			17,3							
51 » » Chevaux	33,6	30,6	30	33	24	32,3	15	37	30,3	31	31	34,3	18,6	16,3	10			10							
52 » » nr. 59	26	35,6	24,5	36	22,6	32,5	13,6	30,6	25,6	32,3	27,3	32,3	16,6	16,6	22,5		7,6	21,6							
53 1938	36	32,1	26,6	33,6	19,3	29	13,6	32,3	25,3	29,6	25,6	31	17	18	33,6			22,6		11,6					
54 Brisson	25,6	28,3	21,6	25,6	14,6	24,6	12	24,3	18,3	24	18	20,6	14,3	13,3						10,3					
55 Cl. cochlearium	37	35,6	24,6	34	23,3	31,3	12,6	26,6	24,6	30	32	29,6	20,6	22,3											
56 Cl. chauvoei	29	30,5	22,3	28	16,3	21,3	10,6	23,6	22,3	26,3	21,3	22,6	18	15											
57 Cl. bifermentans	24	26	23,3	27,6	16,3	25	14,6	27,3	22	29	25,3	30,5	19	16,6			10	12,6		8					
58 Cl. sordellii	31	31,3	23,3	27	13,3	24	9	27,3	22,3	29	25,3	28,3		16,6	26,8			8,6		8,3					
59 Cl. sporogenes	30,3	29,3	22,6	29,3	18	21	14	24,6	20	27	23	20	14,3	17,6				8,6							
60 Cl. tallax	32,6	29,3	30,3	28,3	17,3	24	14,6	32,6	32,3	34	35,3	34,6	20	16,3				11,3			12,6				
61 Cl. gigas	45,6	50	35,3	38,3	29,5	38	20	38,3	36,6	38,3	38	37,6	30	26	9		10	21,3	—	11	14,3	7			
Cl. tertium	29,3	25	25	28,3	17,3	27,6	12,6	37,3	25,6	28	21	27,6	—	16,3	20,4	18,3	-	—	—	—	—	—	—	—	—

Légende:

Les chiffres indiquent le diamètre de la zone d'inhibition en mm, inclusivement la rondelle
R.h rondelles humides
R.s rondelles seches
x n'a pas été effectue
— absence de zone d'inhibition
Les quantités indiquées en tête de la colonne, en unités ou gamma représentent les quantités qui se sont trouvées effectivement sur les rondelles de papier filtre.

c) Une zone plus ou moins étendue de croissance secondaire des colonies ésistantes, qui a son point de départ à la marge de la zone d'inhibition et se dirige ers l'intérieur (Fig. 3 et 5). Contrairement aux aspects *(a)* et *(b)*, la modification *c)* s'accentue lorsque la durée d'incubation est prolongée, bien qu'elle apparaisse, hez certaines souches au cours même de la formation de la zone d'inhibition.

d) Une zone où la croissance microbienne est plus intense, plus stimulée, pparaissant soit à la limite de la zone d'inhibition et de celle de croissance (Fig. 6) oit en dehors, dans la zone primaire de croissance (Fig. 6 et 7), ou bien en dehors e la zone secondaire de croissance (Fig. 8). La zone de stimulation, également bservée par Peyré chez les germes aérobies (21), considérée par Krasilnikov omme un phénomène ayant une valeur générale pour l'antagonisme microbien 22), a été très souvent observée par nous. Bien qu'il paraisse que certaines espèces résentent plus fréquemment l'apparition de ces zones *(Cl. sporogenes, Cl. coch-earium, Cl. histolyticum* — Fig. 8 et 9) nous l'avons rencontrée presque chez outes les espèces et en présence de tous les antibiotiques.

Un tel phénomène paraît correspondre à une loi biologique d'ordre général, alable pour toute une série de substances à caractère toxique, enzymatique, nédicamenteux, etc. Nous rappelons le fait constaté par von Holt (23), que les ntibiotiques ajoutés aux milieux de culture en petites quantités jouent un ôle stimulateur.

En plus de la zone de croissance secondaire du bord de la zone d'inhibi-on, nous avons également constaté l'apparition de colonies résistantes sur l'aire 'inhibition proprement dite; en ce cas, leur apparition est plus tardive (après 8 heures) (Fig. 10 et 11).

DISCUSSION

1. On considère comme un fait unanimement reconnu que la méthode 'appréciation de la résistance aux antibiotiques par dilutions successives en nilieu liquide est plus exacte que celle de la diffusion en gélose. Selon nous, en ce ui concerne les germes anaérobies, la situation pourrait être différente, peut-être cause de la diversité des techniques utilisées, qui doivent tenir compte des ifficultés présentées par l'anaérobiose elle-même. Ceci pourrait expliquer les randes différences entre les données obtenues par les différents auteurs, qui nt appliqué la technique des dilutions en milieu liquide et dont nous citons uelques exemples:

a) *Auréomycine* — de Fagonde (13), utilisant la méthode rapide au vert nus, constate que l'auréomycine a une action beaucoup plus réduite que celle e la pénicilline ou même de la streptomycine vis-à-vis des germes anaérobies. elon cet auteur, le *Cl. tetani*, considéré comme très résistant, n'est inhibé que ar 40μg ml d'auréomycine et le *Cl. histolyticum* que par 80μg ml. De Fagonde rouve que l'emploi dans la clinique de cet antibiotique ne serait pas justifié.

Au cours de la même année, Whitlock et Tashman (3) trouvent, par contre, ue les différentes espèces clostridiennes sont inhibées par l'auréomycine, en uantité d'environ 0,03μg/ml.

D'un autre côté, Ponomarev (24) obtient de très bons résultats en traitant es animaux infectés expérimentalement avec le *Cl. welchii*, par une dose unique 'auréomycine.

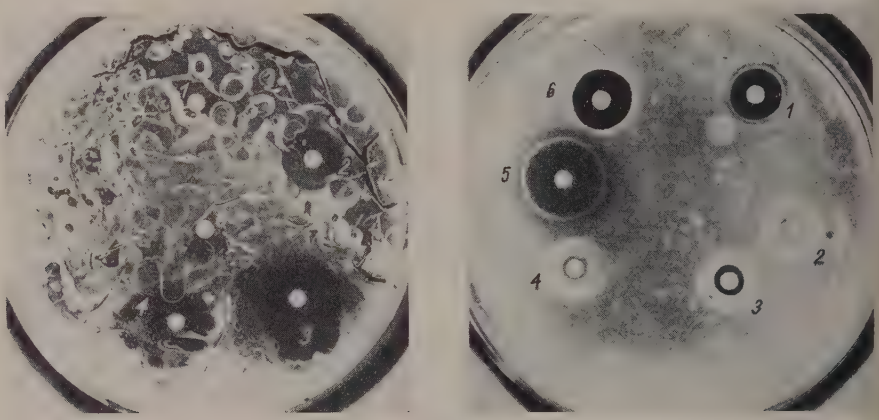


Fig. 1. Résistance à la bacitracine acquise expérimentalement chez le *Cl. oedematiens* et modification corrélative des autres caractères.

a — souche initiale — *Cl. oedematiens* 79: sensibilité à la bacitracine avec colonies résistantes sur la zone; formation abondante de gaz; absence des zones accentuées de croissance. 1 — chlorocide 5γ; 2 — magnamycine 5γ; 3 — érythromycine 5γ; 4 — bacitracine 2u; 5 — nitrofuran 5γ; 6 — polymyxine 5γ; (rondelles humides).

b — souche de *Cl. oedematiens* 79 variante; résistance à la bacitracine; croissance abondante sans gaz; anneaux de croissance accentuée pour tous les antibiotiques. 1 — magnamycine 5γ; 2 — polymyxine 5γ; 3 — bacitracine 2u; 4 — nitrofuran 5γ; 5 — érythromycine 5γ; 6 — chlorocide 5γ; (rondelles humides).

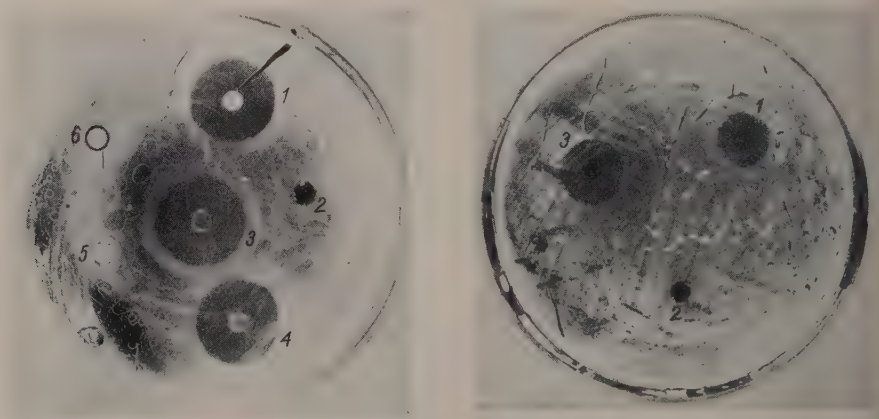
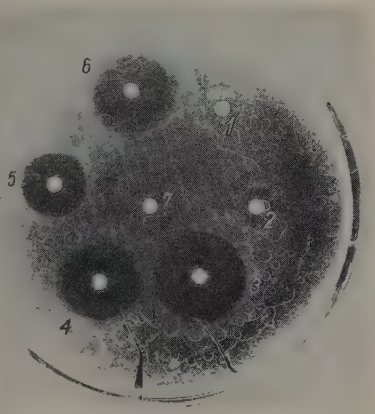


Fig. 2. Différence marquée des zones d'inhibition à l'érythromycine et tetracycline chez un anérobie stricte *(Cl. tetani)* et chez un anaérobie moins exigeant *(Cl. perfringens)*, l'intensité du développement microbien étant pareil pour les deux.

a — *Cl. tetani* 47 D. 1 — terramycine 30γ; 2 — superseptil 400γ; 3 — tetracine 30γ; 4 — érythromycine 10γ; 5 — polymyxine 15γ; 6 — salvoseptil 400γ; (rondelles sèches)

b — *Cl. perfringens type A — Lechien.* 1 — tetracine 30γ; 2 — superseptil 400γ; 3 — érythromycine 10γ; (rondelles sèches).



ig. 3. Délimitation nette entre la zone d'inbition et la zone de croissance et zones croissance secondaire chez le *Cl. tetani.*
— bacitracine 2u ; 2 — nitrofuran 5γ;
— érythromycine 5γ; 4 — chlorocide 5γ;
— magnamycine 5γ; 6 — hostacycline 5γ;
— polymyxine 5γ; (rondelles humides).

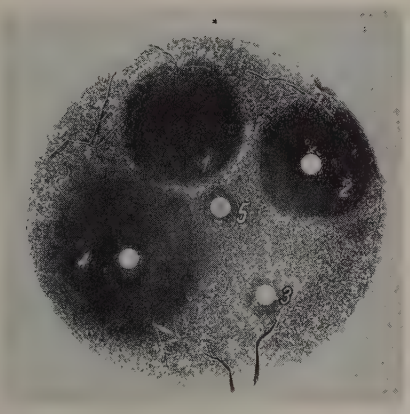
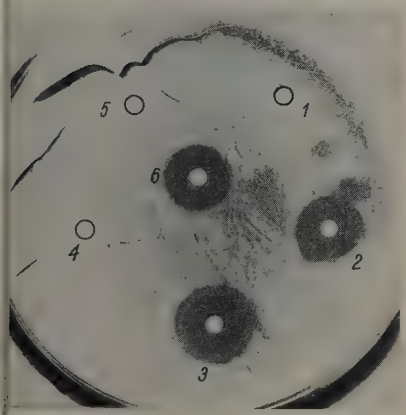


Fig. 4. Délimitation faiblement marquée entre l'aire d'inhibition et celle de croissance microbienne chez le *Cl. tetani.*
1 — chlorocide 30γ; 2 — auréomycine 30γ;
3 — streptomycine 30γ; 4 — pénicilline 30u;
5 — néomycine 100γ; (rondelles sèches).



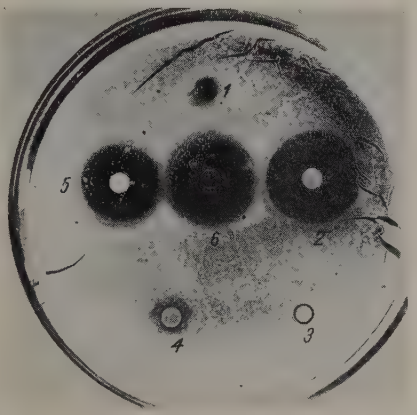


Fig. 5. Aspects de croissance secondaire à la limite de la zone d'inhibition.
— *Cl. sordellii :* zone de croissance secondaire en présence de la pénicilline. 1 — tyrocidine 5γ; 2 — auréomycine 5γ; 3 — pénicilline 1U.I. 4 — gramicidine 5γ; 5 — tyrothricine 5γ; 6 — hostacycline 5γ; (rondelles humides).
— *Cl. histolyticum* 503; zone de croissance secondaire en présence de la terramycine et tétracine (tétracycline). 1 — superseptil 400γ; 2 — érythromycine 10γ; 3 — polymyxine 15γ; 4 — salvoseptil 400γ; 5 — terramycine 30γ; 6 — tétracine 30γ; (rondelles sèches).

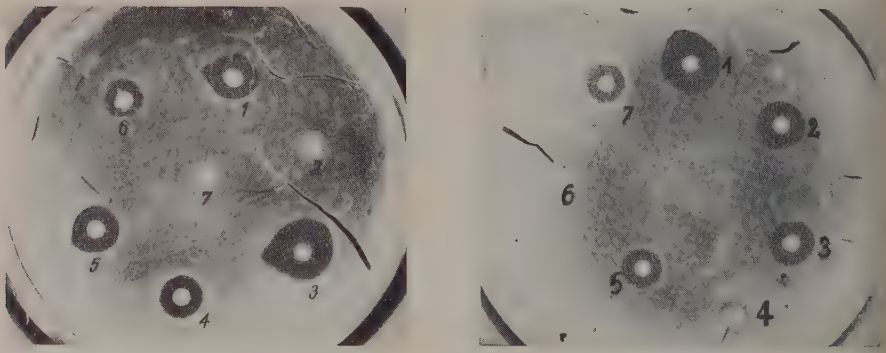


Fig. 6. Aspects d'intensification de la croissance à la limite de séparation entre la zone d'inhibition et la zone de croissance primaire.

a — *Cl. bifermentans :* stimulation accentuée de la croissance à la limite de séparation en présence du chlorocide (chloramphénicol); accentuation de la zone de croissance primaire en présence de l'oxytétracycline (terramycine). 1 — bacitracine 2u; 2 — nitrofuran 5γ; 3 — érythromycine 5γ; 4 — chlorocide 5γ; 5 — magnamycine 5γ; 6 — oxytétracycline 5γ; 7 — polymyxine 5γ; (rondelles humides).

b — *Cl. sordellii*: stimulation nette de la croissance à la limite de séparation en présence de l'oxytétracycline (terramycine). 1 — magnamycine 5γ; 2 — érythromycine 5γ; 3 — chlorocide 5γ; 4 — nitrofuran 5γ; 5 — bacitracine 2u; 6 — polymyxine 5γ; 7 — oxytétracycline 5γ; (rondelles humides).

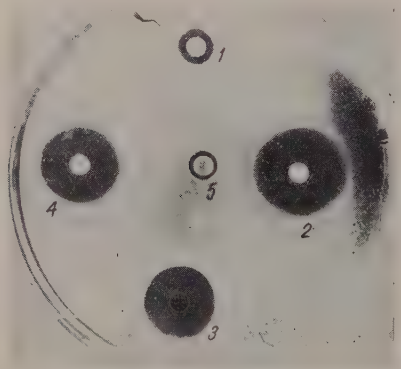


Fig. 7. Zone étendue de stimulation de la croissance dans la région de développement primaire.

Cl. histolyticum 503: stimulation de la croissance en présence de la pénicilline. 1 — streptomycine 30γ; 2 — pénicilline 30U.I.; 3 — chlorocide 30γ; 4 — auréomycine 30γ; 5 — néomycine 100γ; (rondelles sèches).

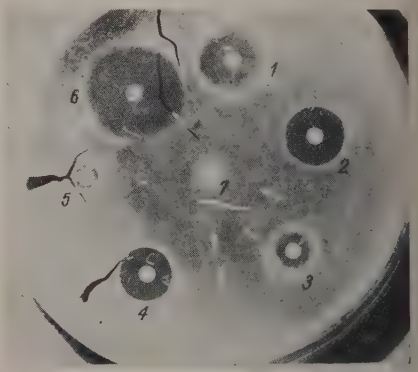


Fig. 8. Zones de croissance stimulée à l'extérieur des zones de développement secondaire.

Cl. cochlearium: croissance stimulée en présence du chlorocide et de l'oxytétracycline à l'extérieur des zones de croissance secondaire. 1 — chlorocide 5γ; 2 — magnamycine 5γ; 3 — oxytétracycline 5γ; 4 — bacitracine 2u; 5 — nitrofuran 5γ; 6 — érythromycine 5γ; 7 — polymyxine 5γ; (rondelles humides).

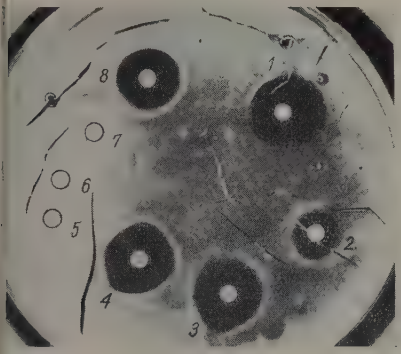


Fig. 9. Zones de croissance stimulée chez *Cl. sporogenes* en présence de tous les antibiotiques étudiés.
1 — pénicilline 1U.I.; 2 — oxytétracycline 5γ; 3 — hostacycline 5γ; 4 — érythromycine 5γ; 5 — tyrocidine 5γ; 6 — tyrothricine 5γ; 7 — gramicidine 5γ; 8 — auréomycine 5γ (rondelles humides).

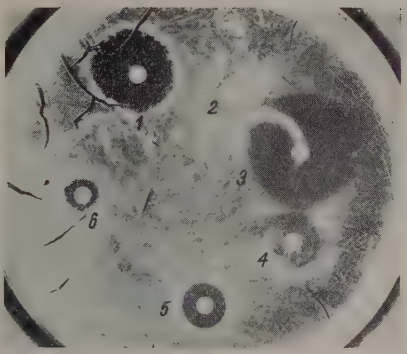
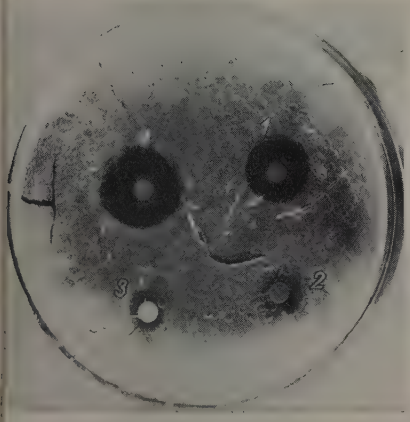


Fig. 10. Aspects de croissance secondaire à l'intérieur de la zone d'inhibition.
Cl. fallax : aspect inaccoutumé de la croissance secondaire, résistante à l'érythromycine; colonies secondaires résistantes disséminées sur toute l'aire d'inhibition en présence de la bacitracine et de la polymyxine; invasion secondaire totale de l'aire en présence du chlorocide. 1 — bacitracine 2u; 2 — nitrofuran 5γ; 3 — érythromycine 5γ; 4 — chlorocide 5γ; 5 — magnamycine 5γ; 6 — polymyxine 5γ; (rondelles humides).



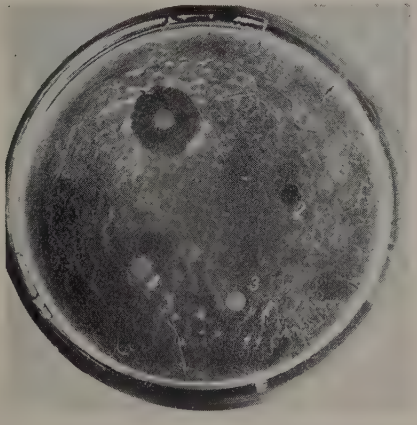


Fig. 11. Variation considérable de la sensibilité aux sulfamides chez deux souches de la même espèce.
a — *Cl. perfringens* B.P.$_6$ K.: sensibilité accentuée au salvoseptil. 1 – terramycine 30γ; 2 — néomycine 100γ; 3 — polymyxine 15γ; 4 — salvoseptil 400γ; (rondelles sèches).
b — *Cl. perfringens* 1938: résistance totale au salvoseptil. 1 — terramycine 30γ; 2 — néomycine 100γ; 3 — polymyxine 15γ; 4 — salvoseptil 400v; (rondelles sèches).

b) *Chloramphénicol* — selon MAZUREK (14) qui a étudié l'action du chloramphénicol par la méthode au vert janus, l'emploi de cet antibiotique ne serait non plus justifié en clinique.

c) *Pénicilline* — selon WILLICH (6) l'action de la pénicilline vis-à-vis des bacilles anaérobies Gram-positifs serait moins efficace que l'action des sulfamides, ce qui est en flagrante contradiction avec les données de l'ensemble des autres recherches.

De pareille contradictions, dont nous n'avons cité que quelques exemples ne se rencontrent point dans le nombre restreint de travaux des auteurs qui ont utilisé la technique de la diffusion en gélose. Nos recherches confirment, dans leur ensemble, les résultats obtenus par BÉERENS et de LAVERGNE (17, 18), qui ont utilisé la technique de la diffusion linéaire en gélose.

Pour l'évaluation des résultats obtenus avec la technique employée, exposée dans le présent travail, nous proposons le schéma suivant:

— diamètre de la zone d'inhibition — < 15 mm — résistance
— diamètre de la zone d'inhibition — 15 — 20 mm — sensibilité modérée
— diamètre de la zone d'inhibition — 20 — 30 mm — sensibilité
— diamètre de la zone d'inhibition — 30 — 40 mm — sensibilité accentuée
— diamètre de la zone d'inhibition — > 40 mm — sensibilité très accentuée.

2. En ce qui concerne les indications thérapeutiques, nous nous rallions à l'opinion de de LAVERGNE (25), aux indications du manuel de HUSSAR (26), ainsi qu'à celles d'autres auteurs, dans le sens que nous considérons la pénicilline, le groupe des tétracyclines, le chloramphénicol, l'érythromycine et la bacitracine comme des antibiotiques d'élection pour les germes anaérobies du genre *Clostridium*, (éventuellement on pourrait y ajouter aussi la magnamycine). En même temps, nous sommes d'avis qu'on doit accorder la prioriré à la pénicilline, vu que:

— nos données montrent que la pénicilline est très active, même à de faibles concentrations, qui peuvent être atteintes dans la circulation, de même qu'au niveau de la plaie infectée;

— la pénicilline peut être administrée en grande quantité, même aux organismes intoxiqués;

— jusqu'à présent, du moins, on n'a pas constaté de souches clostridiennes anaérobies résistantes à la pénicilline.

Cette dernière affirmation exige toutefois certaines explications: nous avons montré plus haut que nous avons eu l'occasion d'isoler une souche de *Cl. perfringens* à résistance passagère vis-à-vis de la pénicilline. Cette souche a provoqué la mort de la malade. CROFTS et EVANS (27) ont observé dans leurs expériences qu'une souche de *Cl. perfringens*, qui présentait une résistance temporaire acquise vis-à-vis de la pénicilline et des signes morphologiques d'involution, a conservé sa pathogénité intacte. Afin de prévenir l'installation de la résistance, même temporaire, on doit donc utiliser la pénicilline en fortes doses — bactériolytiques.

Bien que la majorité des auteurs aient montré que la streptomycine n'a pas d'action sur les anaérobies, les cliniciens continuent à l'administrer dans les infections humaines. De LAVERGNE explique cette attitude par le fait qu'on tente de combattre la flore associée, ce qui n'explique d'ailleurs pas la raison

e l'emploi de la streptomycine, par certains auteurs, dans une infection à prédominence anaérobie nette, comme par exemple la septicémie « post-abortum » ue au *Cl. perfringens* (28, 29).

L'explication du manque d'activité de la streptomycine serait fournie par es conditions mêmes d'anaérobiose. Ainsi, WILLIAMSON et WHITE montrent, n 1956 (30), que la dihydrostreptomycine est beaucoup moins active en anaérobiose. POUTEAU-THOUVENOT, toujours en 1956 (31), affirme que la streptomycine empêche l'utilisation du fer dans l'oxydation aérobie.

Nous avions signalé, déjà en 1952 (19), que la streptomycine a exercé une ction 6 fois plus grande en conditions d'aérobiose qu'en anaérobiose, sur un treptocoque hémolytique, aérobie et facultativement anaérobie.

Les raisons de l'action inconstante des sulfamides sont encore peu claires. Le présent travail montre que l'action des sulfamides a été très variable, non eulement d'une souche à l'autre (fig. 11), mais aussi d'une détermination à autre. D'ailleurs, TAYLOR (32), dans son tableau des erreurs par répétition u cours de l'antibiogramme, a mis au premier rang les sulfamides.

De notre côté, nous ne voyons pas quel serait le rôle joué par l'éventuel ffet inhibiteur de la peptone du milieu, incriminé par certains auteurs, i les déterminations sont répétées, comme dans notre cas, sur le même lot de nilieu de culture.

3. La gamme suffisamment large d'antibiotiques dont nous disposons ontre les anaérobies du genre *Clostridium*, ainsi que la gravité de ces infections, oulèvent le problème de l'association des antibiotiques. Les résultats des recherches entreprises à ce sujet feront l'objet d'une communication ultérieure.

CONCLUSIONS

1. On a étudié la sensibilité vis-à-vis de 17 antibiotiques et sulfamides, n différentes dilutions, de 62 souches appartenant à 13 espèces du genre *Clostridium*, à l'aide d'une méthode simple de diffusion circulaire en gélose, décrite ar l'un des auteurs déjà en 1952, ressemblant à celle employée par CHABBERT n 1951. Cette méthode peut se réaliser avec des disques en papier filtre, mprégnés avec des antibiotiques au moment de l'utilisation ainsi qu'avec des isques imprégnés et séchés, préparés sur échelle industrielle.

On a effectué en tout plus de 5000 déterminations.

2. De l'ensemble des recherches il résulte que toutes les espèces étudiées — *Cl. perfringens*, types A, B, C, D, E, F, *Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. cochlearium*, *Cl. chauvoei*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. gigas* et *Cl. tertium* ont été sensibles aux antibiotiques suivants: pénicilline, auréomycine, chloramphénicol, terramycine tétracycline, érythromycine et magnamycine. A l'exception des *Cl. tetani*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii* et *Cl. tertium*, toutes les autres espèces sont également sensibles à la bacitracine.

Les 13 espèces étudiées ont été insensibles aux antibiotiques: nitrofuran, néomycine, streptomycine, polymyxine, gramicidine, tyrocidine et tyrothricine, à l'exception des 5 souches de *Cl. oedematiens* et de 4 des 5 souches de *Cl. septicum* qui ont été sensibles à la néomycine.

3. En ligne générale on n'a pas constaté de variations importantes entre la sensibilité des souches appartenant à une même espèce, envers les différents

antibiotiques. L'ordre d'activité des antibiotiques est, dans l'ensemble, similaire pour toutes les espèces. On a observé que les espèces les plus sensibles aux antibiotiques sont celles qui exigent un degré élevé d'anaérobiose et inversement, les moins sensibles sont plus tolérantes.

4. Parmi les souches étudiées aucune n'était résistante aux principaux antibiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bliss E. A., Warth P. T. et Chandler C. A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1950, **53,** 277.
2. Bliss E. A. et Warth P. T. — Bact. Proceed., 1950, 96.
3. Whitlock C.M. Jr. et Tashman S. G. — J. Bact., 1950, **59,** 314.
4. Heilman F. R., Herrell W. E., Wellman W. E. et Geraci J. E. — Proceed. Staff Meet. Mayo Clin, 1952, **27,** 285.
5. Kiser J. S., de Mello G. C., Reichard D. H. et Williams J. H. — J. infect. Dis., 1952, **90,** 76.
6. Willich G. — Ztschr. f. Hyg., 1952, **134,** 573.
7. Neceaevskaia M. R. — Sborn. trud.. Hark. N.I.I.V.S. im. Mecin., 1955, **21,** 129.
8. Kalinicenko N. F. et Zimina O. I. — Idem, 135.
9. Berger U. — Ztschr. f. Hyg., 1958, **144,** 480.
10. Berger U. — Ztschr. f. Hyg., 1958, **145,** 1.
11. Berger U. — Ztschr. f. Hyg., 1958, **145,** 160.
12. Prévot A. R. — Ann. Inst. Pasteur, 1946, **72,** 471.
13. de Fagonde A. P. — Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79,** 908.
14. Mazurek C. — Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79,** 905.
15. Stevens W. C. et Harrison Jr. A. P. — Antib. a. Chemother., 1958, **8,** 192.
16. Reimann B. — Zblt. f. Bakt. Orig., 1952—53, **159,** 88.
17. Béerens H. et Guillaume J. — Ann. Inst. Pasteur, 1954, **86,** 781.
18. de Lavergne E., Burdin J. C., Schmitt J. et Le Moyne M. T. — Ann. Inst. Pasteur, 1956, **91,** 631.
19. Bittner J. et Klein R. — Rev. de Igienă, Microbiol. şi Epidemiol., 1952, **6,** 14.
20. Chabbert Y. — Ann. Biol. Clin., 1951, **9,** 544.
21. Peyré M. et Velu H. — Rev. d'Immunol., 1952, **16,** 142.
22. Krasilnikov N. A. — Antagonizm mikrobov i antibioticeskie veşcestva, 1958, Moskva, Sovetskaia Nauka.
23. von Holt C. — Deutsche Med. Wochenschrift, 1952, **77,** 341.
24. Ponomarev K. A. — Antibiotiki, 1957, **2,** 27.
25. de Lavergne E., Burdin J. C. et Schmitt J. — Presse Méd., 1957, **65,** 1054.
26. Hussar A. E. et Holley H. L. — Antibiotics and antibiotic therapy, 1954, New York, Macmillan Co., 213.
27. Crofts J. E. et Evans D. G. — Brit. J. exp. Pathol., 1950, **31,** 550.
28. Szendi B. — Acta Med. Acad. Scient. Hung., 1958, **11,** 237.
29. Merger R. — Tunisie médicale, 1954, **42,** 533.
30. Williamson G. M. et White F. — J. gen. Microbiol., 1956, **14,** 637.
31. Pouteau-Thouvenot M. — Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy, 1956, No. 63.
32. Taylor C. E. D., Heimer G. V. et Spicer C. O. — J. Clin. Path., 1958, **11,** 421.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ АНАЭРОБОВ РОДА *CLOSTRIDIUM* ОПРЕДЕЛЯЕМАЯ «in vitro» ПУТЕМ ЦИРКУЛЯРНОЙ ДИФФУЗИИ В АГАРЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Изучали чувствительность 62-х штаммов принадлежащих к 13 видам рода *Clostridium*, к 17 антибиотикам и сульфонамидам в разных разведениях, при помощи простой методики циркулярнсй диффузии в агаре, описанной одним из авторов в 1952 и сходной с методом описанным Шабером в 1951 г. Данная методика применяема как с дисками фильтровальной бумаги, пропитанными антибиотиками в момент пользо-

ания, так и с пропитанными и высушенными дисками, изготовленными в производственном масштабе.

В общем проведены свыше 5000 определений чувствительности.

2. Установлено, что в общем исследованные виды, а именно: *Cl. perfringens*, типы A, B, C, D, E, F, *Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*. *Cl. septicum*, *Cl. cochlearium*, *Cl. chauvoei*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. gigas*, *Cl. tertium* чувствительны к пенициллину, ауреомицину, хлорамфениколю, террамицину, тетрациклину, эритромицину, бацитрацину, магнамицину и нечувствительны к нитрофурану, неомицину, стрептомицину, полимиксину, грамицидину, тироцидину и тиротрицину.

Чувствительность к сульфамидам сальвосептил и суперсептил проявляет широкие колебания, как у штаммов, принадлежащих к тому-же виду, так и от одного исследования к другому.

Исключение от вышеупомянутых данных составляет следующее:

— Все штаммы *Cl. tetani* (22) нечувствительны к бацитрацину, также как и штаммы *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii*, *Cl. tertium*. Все 5 штаммов *Cl. oedematiens* и 4 из 5 штаммов *Cl. septicum* чувствительны к неомицину.

3. В общем не установлены значительные отличия в чувствительности штаммов принадлежащих к тому-же виду, причём степень действия разных антибиотиков находится в общем, в том-же порядке у всех видов.

Наиболее чувствительными к антибиотикам являются виды с наибольшей нуждой в анаэробиозе, и наоборот, наименее чувствительными являются микроаэрофильные виды.

6. Среди изучаемых штаммов не обнаружен ни один устойчивый к главным антибиотикам.

DIE « IN VITRO » DURCH KREISFÖRMIGE DIFFUSION IN AGAR BESTIMMTE EMPFINDLICHKEIT DER ANAEROBEN AUS DER GATTUNG *CLOSTRIDIUM* FÜR ANTIBIOTIKA

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe einer von einem der Verfasser im Jahre 1952 beschriebenen und der von Chabbert (1951) angegebenen ähnlichen, einfachen Methode der Kreisförmigen Diffusion in Agar, wurde die Empfindlichkeit von 62, zu 13 Arten der Gattung *Clostridium* gehörenden Stämmen für 17 Antibiotika und Sulfonamide in verschiedenen Verdünnungen geprüft. Bei diesem Verfahren können sowohl im Augenblick des Gebrauchs mit dem Antibiotikum durchtränkte Filterpapierscheibchen als auch die industriell hergestellten, imprägnierten und getrockneten Scheiben verwendet werden.

Insgesamt wurden über 5000 Bestimmungen durchgeführt.

2. Es wurde festgestellt, dass die geprüften Arten *(Cl. perfringens*, Typen A,B,C,D,E,F ; *Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. cochlearium*, *Cl. chauvoei*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. gigas*, *Cl. tertium)* im grossen und ganzen für Penizillin, Aureomyzin, Chloramphenikol, Terramyzin, Tetrazyklin, Erythromyzin, Bazitrazin und Magnamyzin empfindlich und für Nitrofuran, Neomyzin, Streptomyzin, Polymixin, Gramizidin, Thyrotrizin und Thyrozidin unempfindlich sind.

Die Empfindlichkeit für die Sulfonamide Salvoseptyl und Superseptyl ist sehr verschieden, sowohl bei den Stämmen derselben Art als auch von einer Bestimmung zur anderen.

Es gibt folgende Ausnahmen von den obigen Angaben:

Alle (22) untersuchten Stämme von *Cl. tetani* waren für Bazitrazin unempfindlich; desgleichen die Stämme von *Cl. hystolyticum*, *Cl. sordellii* und *Cl. tertium*. Die 5 untersuchten Stämme von *Cl. oedematiens* und 4 der 5 Stämme von *Cl. septicum* sind für Neomyzin empfindlich.

3. Im allgemeinen wurden bei den Stämmen einer Art keine bedeutenden Unterschiede der Empfindlichkeit festgestellt, und bei allen Arten ist die Ordnung der Wirksamkeit der Antibiotika im grossen ganzen die gleiche.

Die empfindlichsten Arten sind die mit den höchsten Ansprüchen an die Anaerobiose und umgekehrt, sind die Mikroaerophilen Arten am wenigsten empfindlich.

4. Unter den untersuchten Stämmen wurde kein einziger gegen die hauptsächlichen Antibiotika widerstandfähiger angetroffen.

THE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF ANAEROBES OF THE GENUS *CLOSTRIDIUM*, AS DETERMINED « IN VITRO » BY MEANS OF CIRCULAR DIFFUSION IN AGAR

SUMMARY

1. The susceptibility of 62 strains belonging to 13 species of the genus *Clostridium* to 17 antibiotics and sulphonamides in various dilutions was investigated by means of a simple method of circular diffusion in agar. This method was devised by one of the authors in 1952 and resembles the method described by CHABBERT in 1951. Both filter paper disks soaked with the antibiotic at the moment they are used and commercial soaked and dried disks may be used.

On the whole, 5000 determinations have been carried out.

2. On the whole, the species investigated, i.e. *Cl. perfringens* types A,B,C,D,E,F, *Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl, histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. cochlearium*, *Cl. chauvoei*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. gigas*, and *Cl. tertium* were found to be susceptible to penicillin, aureomycin, chloramphenicol, terramycin, tetracycline, erythromicin, bacitracin, magnamycin, and not susceptible to nitrofuran, neomycin, streptomycin, polymixin, gramicidin, tryocidin, and tyrothricin.

The susceptibility to the sulphonamides salvoseptyl and superseptyl displays great variations from one strain to another of the same species as well as from one determination to the other.

The following are exceptions to the above statements:

None of the (22) strains of *Cl. tetani* or of the strains of *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii*, and *Cl. tertium* was susceptible to bacitracin. The 5 strains of *Cl. oedematiens* and 4 out of 5 strains of *Cl. septicum* were susceptible to neomycin.

3. As a rule, no considerable differences were found to exist between the susceptibilities of strains belonging to the same species, and the order of activity of the antibiotics is more or less the same in all species.

The most exacting species as regards anaerobiosis are the most susceptible to antibiotics and conversely, the least susceptible ones are the microaerophilic species.

4. Among the strains investigated, none was found to be resistant to the main antibiotics.

L'INFLUENCE DE L'IRRADIATION IONISANTE SUR L'ÉVOLUTION ET LE TRAITEMENT AU NÉOSALVARSAN DE LA TRYPANOSOMIASE EXPÉRIMENTALE DU RAT

par

N. Munţiu, N. Chelemen, T. Andrian, I. Corneci, I. Băditoiu et C. Iuga

Travail du Laboratoire de Médecine Vétérinaire du Ministère des Forces Armées et de l'Institut de Recherches Pharmaceutiques et pour le contrôle du Médicament)

— Manuscrit reçu le 12 juillet 1960 —

L'influence favorisante de l'irradiation ionisante sur la réceptivité de l'organisme vis-à-vis des infections endogènes et exogènes est bien établie. Néanmoins, le mécanisme biologique de l'irradiation ionisante qui détruit la défense naturelle de l'organisme, l'abandonant à l'infection, est moins bien connu (1).

Les mécanismes de défense sont multiples et compliqués. Parmi les facteurs devant être pris en considération, il faut citer: les barrières cutanées et muqueuses; la fonction de barrière exercée par les ganglions lymphatiques et par les cellules du système réticulo-endothélial; l'inflammation et la phagocytose; la réactivité des cellules de l'organisme; l'immunogenèse.

Il faut retenir que les mécanismes de défense de l'organisme cités plus haut n'agissent pas séparément, mais dans une interdépendance intime et sous la direction du système nerveux central.

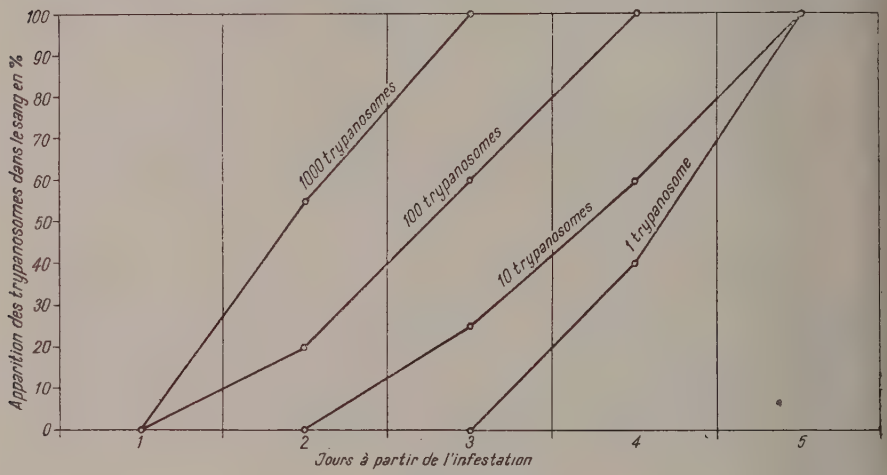
La littérature est riche en expériences qui prouvent l'effet nocif direct de l'irradiation ionisante sur chacun de ces mécanismes.

L'augmentation de la perméabilité de la barrière cutanée et muqueuse a été prouvée par Troitski (2), Kiselev (3), Tumanian et Sosnovskaia (cités par Troitski, (2), etc. Le rôle négatif de l'inhibition de la réaction inflammatoire par irradiation a été montré par Sosova (4), Sihodirov (5) et d'autres auteurs. Lambert et Richley (6), Esplin, Marcus et Donaldson (7) ont observé la diminution de la fonction phagocytaire, les premiers l'attribuant à l'augmentation de l'héparine et les derniers au mécanisme cortico-adrénalien. L'effet négatif des doses sous-léthales sur la fonction anti-infectieuse du foie et de la rate a été souligné par Miscenko (8), Kiselev, Siverteva et Buzini (9).

La diminuation de la réactivité cellulaire due à l'irradiation a été prouvée surtout vis-à-vis des rickettsiae (Zinser et Castaneda (10), Greif, Chida et Blumenthal (11)); des virus (Smorodintev (12), Siverteva (13)) et des toxines bactériennes (Kiselev et Karpova (14)).

De nombreux auteurs (Iaroslav et Taliaferro (15), Klemparskaia (16), Alexeeva (17), Troitski (18), Nestoresco et Popesco (19)) ont également constaté l'influence négative de l'irradiation sur l'immunogenèse.

L'effet curatif réduit du sérum et des autres produits thérapeutiques anti-infectieux, anti-toxiques et anti-parasitaires a été mis en évidence par différents auteurs, dans une beaucoup moindre mesure. Ces investigateurs ont montré que les sérums antitoxiques sont moins efficaces pour les animaux irradiés et que pour obtenir les mêmes résultats chez ces derniers, sont nécessaires des quantités 2 à 3 fois plus grandes (Berlogea, Sasarman et Schönfeld (20)). L'explication du phénomène a été mise soit sur le compte de la diminution d'avidité



Graphique 1

des antitoxines, soit sur la présence, dans l'organisme irradié, de certaines substances qui bloqueraient les anticorps.

Des recherches concernant l'effet de la radiation ionisante sur l'évolution et le traitement des trypanosomiases ne nous sont pas connues. Dans des notes préliminaires, l'un de nous a démontré l'importance de la réactivité organique et de l'état d'inhibition ou d'excitation du système nerveux central, en vue d'obtenir l'effet thérapeutique du néosalvarsan dans les trypanosomiases expérimentales chez le rat (21).

La supposition que la maladie d'irradiation, en paralysant les moyens de défense, pourrait exercer des effets négatifs aussi bien sur l'évolution spontanée que sur le traitement de la trypanosomiase, nous a incités à entreprendre les recherches exposées ci-dessous.

a) *Recherches sur l'influence de la maladie d'irradiation dans l'évolution de la trypanosmiase.*

La trypanosomiase expérimentale avec *Trypanosoma brucei* est une maladie à évolution certe mortelle chez le rat. Les trypanosomes apparaissent dans le sang des animaux inoculés par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale après 2 à 5 jours en rapport avec la quantité de germes inoculés, la mort survenant après 5 à 15 jours.

Afin d'avoir des possibilités de comparaison, il est nécessaire que l'inoculum — une fois établi — soit le même pour toutes les déterminations. Dans le but d'établir l'inoculum le plus indiqué, des lots de 16 rats ont été inoculés avec des quantités décroissantes d'environ 1000, 100, 10 et 1 trypanosomes, en poursuivant l'apparition des parasites dans le sang des animaux inoculés. A cet effet, on a contrôlé le nombre de germes dans le sang récolté des animaux infestés par la même méthode que pour les globules rouges. Le sang a été ensuite dilué avec du sang citraté de rat normal, de manière à contenir 10.000, 1000, 100 ou 10 trypanosomes/ml. Chaque rat recevait par voie sous-cutanée 0,1 ml de cette suspension.

Les résultats exprimés dans le graphique 1 montrent que lors d'une inoculation de 1000 trypanosomes, ceux-ci apparaissent dans le sang au bout de 3 à 3 jours. Après une inoculation de 100 trypanosomes, l'incubation a varié entre 2 à 4 jours; après 10, de 3 à 5 jours et après 1, de 4 à 5 jours.

Dans nos expériences, l'inoculum théorique, obtenu après dilution de 10 en 10 du sang, a été d'un trypanosome.

De la même façon a été déterminée la dose d'irradiation unique, nécessaire pour produire la mort de tous les rats, dans 15 jours environ. Cette dose a été évaluée entre 627 et 703 r.

Deux lots de 16 rats ont été irradiés (rayons x) chacun par 703 r (dose unique) (180 Kw, 10 mA, filtre A1 de 0,5 mm, distance du focus 1 m, 37 minutes × 9 r/minute) après quoi l'un des lots a été infesté avec 1 trypanosome, en même temps qu'un 3-e lot de rats non-irradiés (témoins). On a contrôlé l'apparition des trypanosomes dans le sang des animaux des deux lots infestés ainsi que la durée de survie des animaux des trois lots.

Tableau I

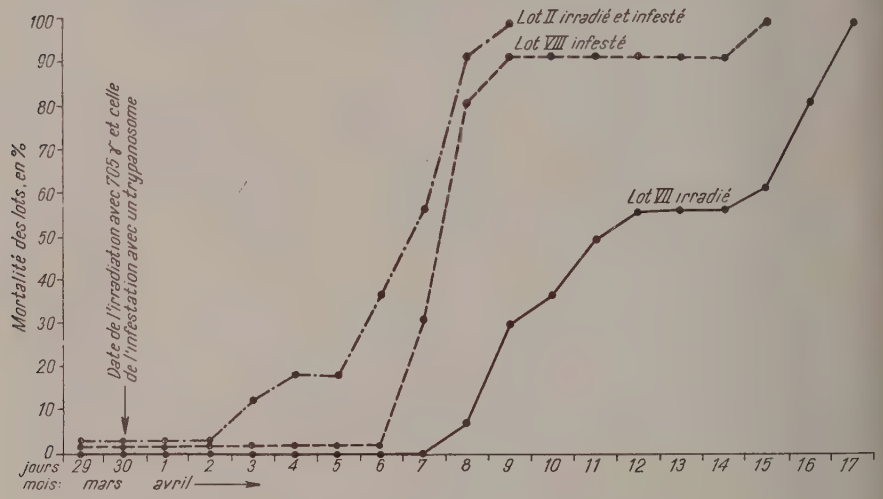
Données comparatives entre la période d'incubation et la durée de survie des rats irradiés avec 703 r, infestés avec un trypanosome

Lots	Date d'infestation par rapport à la date de l'irradiation	Période d'incubation en jours		Durée de survie en jours	
		Limite	Moyenne	Limite	Moyenne
VIII	infestés, non-irradiés	4—5	4,3	7—15	8,2
VI	8 jours après l'irradiation	4—5	4,4	6—9	7,5
V	6 jours après l'irradiation	4—5	4,4	7—9	8,2
IV	4 jours après l'irradiation	4—5	4,5	6—9	7,5
III	2 jours après l'irradiation	4—5	4,6	6—9	7,7
II	même jour que l'irradiation	4—5	4,5	6—9	6,4
I	3 jours avant l'irradiation	4—5	4,3	7—9	8,2
IX	5 jours avant l'irradiation	4—5	4,3	7—13	8,6
VII	irradiés, non-infestés	—	—	8—17	12,6

Dans le tableau I on observe que la période d'incubation a été la même chez les animaux irradiés (second lot) que chez les non-irradiés (lot VIII), soit: 4—5 jours, en moyenne 4,5, respectivement 4,3 jours. En échange, la durée de survie a été plus courte chez les animaux infestés et irradiés (second lot 6—9,

en moyenne 6,4) que chez les animaux infestés et non-irradiés (lot VIII 7—15, en moyenne 8,2) et que chez les rats irradiés et non-infestés (lot VII 8—17, en moyenne 12,6 jours). L'effet de l'irradiation se traduit donc par le raccourcissement de la durée de survie des animaux infestés, tel qu'on peut le constater dans le graphique 2.

Pour vérifier si le rapport de la date d'irradiation avec celle d'infestation exerce une influence sur l'évolution de la maladie, 7 lots de 16 rats chacun,



Graphique 2

ont été infestés: les uns à 8, 6, 4 et 2 jours après l'irradiation, un lot simultanément avec l'irradiation, 2 lots 3 et 5 jours avant l'irradiation, alors que 2 lots ont servi comme témoins: un, seulement irradié et l'autre seulement infesté.

Toujours dans le tableau I et le graphique 2 on observe que la période d'incubation n'a pas été modifiée sensiblement chez les lots irradiés et ni la durée de survie chez les lots qui ont été irradiés 3 ou 5 jours après l'infestation. Cette période a été légèrement raccourcie, ou même non-modifiée pour les lots infestés après 8, 6, 4 et 2 jours à partir de l'irradiation, mais elle a été sensiblement diminuée chez les lots infestés et irradiés simultanément. Ces résultats semblent montrer que l'irradiation influence l'évolution spontanée de la trypanosomiase, seulement lorsqu'elle se produit concomitamment ou avant l'infestation, et non quand elle se produit après 3 ou plusieurs jours.

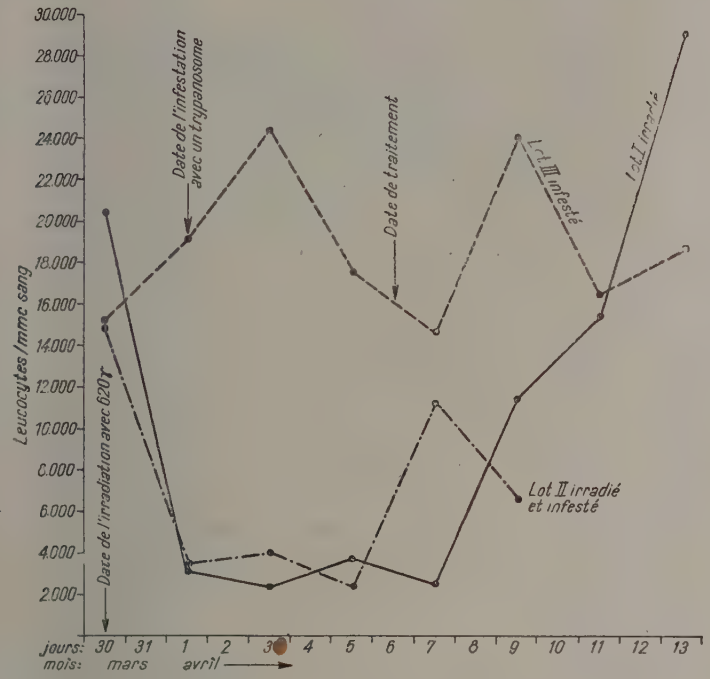
Les résultats concordent avec les données constatées dans d'autres maladies infectieuses et invasives. L'effet négatif de la maladie d'irradiation sur l'évolution de la trypanosomiase est dû à l'inhibition des différents mécanismes de défense organique, indiqués au début de cette note.

Au cours de nos expériences, nous n'avons mis en évidence que l'un de ces mécanismes: diminution des leucocytes (de 16.000 à 2000) et lymphopénie avancée (graphique 3).

L'effet de l'irradiation sur les organes lymphopoïetiques est net. Lorsque ;hez les animaux uniquement infestés, on observe une hyperplasie marquée e la rate, chez les infestés et irradiés, la rate est de dimensions sous-normales.

b) Contrôle de l'influence de la maladie d'irradiation sur l'efficacité du trai-ment au néosalvarsan.

Deux lots de 16 rats chacun, dont l'un irradié 2 jours avant par 627 r sont nfestés avec 0,1 ml d'une suspension contenant 10 trypanosomes/ml. Dès l'ap-



Graphique 3

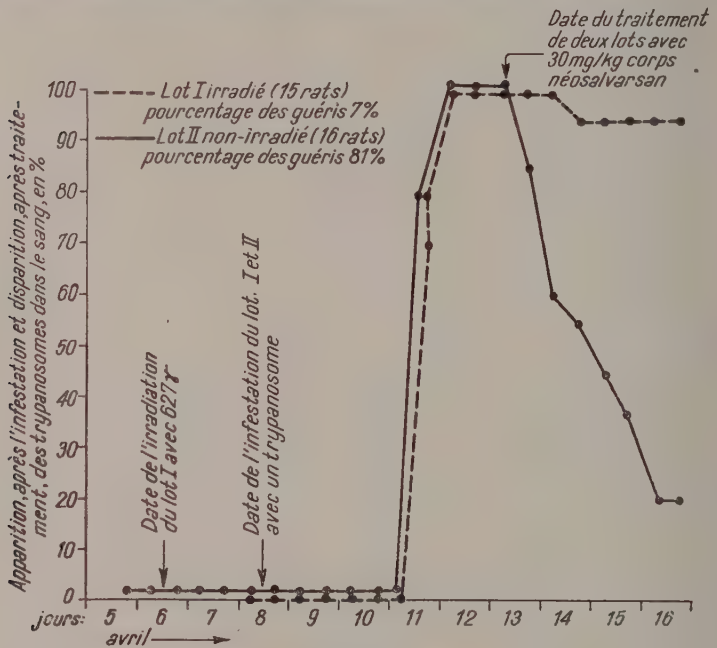
parition chez les rats d'environ 20 trypanosomes sur frottis de sang, on a injecté à ces derniers par 30 mg pour 1000 g poids vivant de néosalvarsan, en contrôlant par examens toutes les 12 heures, le moment de la disparition des parasites du sang de ces animaux. Parallèlement, ont été observés deux lots témoins non-traités, dont l'un infesté et l'autre irradié.

Le résultat d'une première expérience est donné dans le graphique 4.

On constate que les trypanosomes ont disparu, après traitement, du sang de 81% des rats non-irradiés et seulement chez 7% des rats irradiés.

Dans une seconde expérience, après un traitement effectué dans les mêmes conditions, les trypanosomes ont disparu chez 100% des rats non-irradiés, tout en se maintenant dans le sang des animaux irradiés.

L'effet négatif de l'irradiation sur l'efficacité du néosalvarsan est évident, mais n'étant pas à même de préciser l'explication de ce phénomène, des recherches supplémentaires s'imposent. L'effondrement des mécanismes de défense des animaux irradiés en est probablement la cause principale. Tel qu'il a été démontré et qu'il ressort du graphique 3, les rats irradiés présentent une leucopénie (et lymphopénie) avancée. Une autre explication serait la perte de l'avidité du néosalvarsan pour les trypanosomes, le blocage du foie par l'irra-


Date du traitement de deux lots avec 30 mg/kg corps néosalvarsan
Lot I irradié (15 rats) pourcentage des guéris 7%
Lot II non-irradié (16 rats) pourcentage des guéris 81%
Apparition, après l'infestation et disparition, après traitement, des trypanosomes dans le sang, en %
Date de l'irradiation du lot I avec 627
Date de l'infestation du lot. I et II avec un trypanosome
jours:
avril
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Graphique 4

diation (le rendant impropre à renforcer l'action du néosalvarsan), l'apparition ou la disparition de certaines substances dont la présence ou l'absence rendent le néosalvarsan inactif. Il est connu que l'hyperglycémie diminue l'efficacité du néosalvarsan. Les déterminations du glucose, effectuées sur le sang des rats irradiés et infestés, n'ont pas montré de modifications trop importantes de la glycémie.

Nous tâcherons d'élucider ces mécanismes dans des expériences ultérieures. Il est évident que chez les individus présentant la maladie d'irradiation, l'efficacité des arsénobenzènes est diminuée. Sachant que la trypanosomiase expérimentale sert dans le contrôle de l'efficacité des arsénobenzènes, utilisés dans le traitement du luès et qu'une étroite analogie existe entre l'efficacité de ces produits thérapeutiques sur le trypanosome et tréponème, les résultats cités plus haut, soulèvent le problème de l'efficacité thérapeutique des produits spécifiques dans le luès compliqué avec la maladie d'irradiation. Ils soulèvent en même temps le pro-

lème de l'amélioration de la thérapie dans les parasitoses des animaux qui voluent parallèlement avec la maladie de l'irradiation.

Des résultats de ces expériences, nous considérons pouvoir tirer les conclusions suivantes:

1. L'évolution de la trypanosomiase expérimentale du rat, produite par *Trypanosoma brucei*, maladie aiguë et mortelle, a été peu influencée par l'irradiation ionisante, en doses variant entre 627 et 703 r.

2. La période d'incubation (apparition des trypanosomes dans le sang) hez les animaux irradiés a été la même que chez les non-irradiés.

3. La durée de survie des animaux infestés et irradiés a été courte lorsque irradiation a été faite avant ou en même temps que l'infestation. L'irradiation près 5 ou seulement 3 jours de l'infestation n'a plus modifié l'évolution de la rypanosomiase.

4. La leucocytose et l'hyperplasie de la rate, chez les animaux, à la suite le l'infestation aux trypanosomes, ne se perçoit pas chez les rats irradiés et nfestés, chez lesquels la leucopénie et lymphopénie sont régulièrement constatées.

5. L'effet thérapeutique du néosalvarsan dans la trypanosomiase expérinentale du rat est tellement réduit que les doses qui sont actives chez 81—100% les animaux non-irradiés deviennent inactives, ou actives seulement chez 7% les animaux irradiés.

6. L'influence négative de la maladie d'irradiation sur l'efficacité thérapeuique du néosalvarsan est probablement due à l'inhibition des mécanismes nultiples sur lesquels s'appuie la défense naturelle de l'organisme et, en premier ieu, à la baisse brusque et brutale du nombre de leucocytes et lymphocytes, produite par la maladie d'irradiation.

7. La faible efficacité du néosalvarsan chez les animaux où la trypanosomiase évolue concomitamment avec la maladie d'irradiation impose la révision du traitement au « néosalvarsan », lorsque la maladie de l'animal, bénéficiant de ce traitement, se complique par la présence de la maladie d'irradiation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kraevski N.A. — Ocerki patologhiceskoi anatomii, locevoi bolezni. Moscou, Medghiz, 1957, p. 187.
2. Troitski V.I. — Tezisî plenarîh dokladov vșeh konferenții po mediținskoi radiologhii, Moscou. 1956. p. 19.
3. Kiselev P.N. et Buzini P.A. — Deistvie ioniziruiscei radiații na imunitet. Itoghi nauki Colection Acad. de Sc. URSS, Moscou, 1957, p. 284.
4. Sosova V.F. — Tezisî sekt. dokladov po mediținskoi radiologhii, Moscou, 1956. p. 100.
5. Sihodirov V.V. — Biull. radiat. Med., 1954. No. 1, 55.
6. Lambert H.P. et Richley I. — Brit. J. Exp. Path., 1952. **44,** 323.
7. Esplin D.W., Marcus S. et Donaldson D.M. — J. Immunol., 1954. **70,** 545.
8. Miscenko I.P. — Vestn. renghenol. i radiol., 1929. **7,** 496.
9. Kiselev P.N., Siverteva V.N. et Buzini P.A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 2, 54.
10. Zinzer A. et Castaneda D.M. — Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1932. **29,** 840.
11. Greif D., Chida M. et Blumenthal H. — J. Exp. Med., 1953. **97,** 139.
12. Smorodintev A.A. — Tezisî dokladov na vseh konferenții po mediținskoi radiologhii, 1956, Moscou, 80.
13. Siverteva U.N. — Tezisî dokladov na konferenții molodîh ucenik po voprosam mediținskoi radiologhii, Moscou, 1956. 100.

14. Kiselev P.N. et Karpova V.N. — Tezisî sekționîh dokladov vseh konferenții po mediținskoi radiologhii, Moscou, 1956. 86.
15. Iaroslav B.N. et Taliaffero W.H. — Radiation Res., 1956. **3**, 237.
16. Klemparskaia N.I. — Tezisî sekționîh dokladov vseh konf. po mediținskoi radiologhii, Moscou, 1957, 82.
17. Alexeeva O.G. — Vestnik renghenologhii, 1957. No. 1. 8.
18. Troitski V.I. — Vlanie ioniziruiuscei iradiații na imunitet. Voenno-mediținskii jurnal, 1958, p. 53, 2.
19. Nestoresco N. et Popesco Al. — Bul. Rev. Sanit. Milit., 1959, No. 5. 82.
20. Berlogea I., Săsărman Al., Strati I. et Schonfeld S. — Bul. Rev. Sanit. Milit., 1959. No. 5. 88.
21. Oeriu S., Muntiu N., Heytmanek C., Predovici F., Begnesco P. et Zaharia V. — Probleme de Terapeutică — Acad. RPR., 1956. **3**, 147.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ И НА ТЕРАПИЮ НЕОСАЛЬВАРСАНОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРИПАНОСОМИАЗА У КРЫС

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали течение нелеченного заболевания и терапевтический эффект неосальварсана на гомогенных группах из 16-ти крыс каждая, облученных однократно дозами равными 627—703 г. и зараженных инфицирующей дозой *Tripanosoma brucei*.

Результаты опытов проведенных на 300 крысах показали, что течение экспериментального трипаносомиаза мало чем поддается влиянию как в отношении инкубационного периода, так и в отношении продолжительности жизни зараженных животных.

Взамен, терапевтический эффект неосальварсана снижается в такой степени у зараженных и облученных крыс, что терапевтические дозы активные в 100% у необлученных животных могут стать совершенно бездейственными у облученных крыс.

Учитывая то, что экспериментальный трипаносомиаз служит в качестве экспериментальной модели для исследования эффективности арсенобензоловых соединений, вышеуказанные результаты показывают, что при присоединении лучевой болезни, лечение этими препаратами заболеваний животных или людей менее эффективно; в таких случаях необходимо дополнить лечение повышением органической реактивности, упадшей под влиянием облучения.

DER EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLEN AUF DEN VERLAUF UND DIE NEOSALVARSANBEHANDLUNG DER EXPERIMENTELLEN TRYPANOSOMIASE BEI RATTEN

ZUSAMMENFASSUNG

An homogenen Gruppen von je 16 mit Einzeldosen von 627—703 r bestrahlten und mit einer infektiosen Dosis von *Trypanosoma brucei* infizierten Ratten, wurden der spontane Verlauf der Krankheit sowie die therapeutische Wirkung des Neosalvarsans beobachtet.

Die an etwa 300 Ratten durchgeführten Versuche ergaben dass der Verlauf der experimentellen Trypanosomiase weder hinsichtlich der Inkubationsperiode noch der Überlebensdauer der infizierten Tiere nennenswert beinflusst wird.

Dagegen ist die therapeutische Wirkung des Neosalvarsans bei infizierten und bestrahlten Ratten so stark beeinträchtigt, dass bei nicht bestrahlten Tieren 100% wirksame Dosen bei bestrahlten vollkommen wirkungslos werden können.

Da die experimentelle Trypanosomiase als Versuchsmodell für die Prüfung der Wirksamkeit von Arsenobenzolverbindungen dient, lässt sich aus den angeführten Ergebnissen ableiten, dass der Erfolg der Behandlung mit diesen Verbindungen bei tierischen oder menschlichen Erkrankungen herabgesetzt ist, wenn eine Strahlenschädigung hinzutritt. Es ergibt sich also die Notwendigkeit, die Behandlung in solchen Fällen durch eine Anregung der unter der Strahleneinwirkung zusammengebrochenen organischen Reaktivität zu vervollständigen.

HE INFLUENCE OF IONIZING RAYS ON THE COURSE AND THE NEOSAL-ARSAN TREATMENT OF EXPERIMENTAL TRYPANOSOMIASIS IN RATS

SUMMARY

The course of the untreated disease and the therapeutic effect of neosalvarsan have been vestigated in homogeneous groups of 16 rats each, which had been irradiated with single oses anging from 627 to 703 r and inoculated with one infecting dose of *Trypanosoma brucei*.

The results of the experiments performed in about 300 rats showed the course of expe-mental trypanosomiasis to be little influenced as regards both the incubation period and the rvival time of the infected animals.

On the other hand, the therapeutic action of neosalvarsan in infected and irradiated rats decreased to such an extent, that therapeutic doses which are 100 per cent efficient in non-radiated animals may become totally inefficient in irradiated ones.

Since experimental trypanosomiasis is used as an experimental model for testing the ficacy of arsenobenzol compounds, the above results show that little benefit will be derived om treatment with these compounds in animal or human diseases, whenever irradiation disease superimposed on the latter. In these cases, the treatment should be completed by the resto-tion of organic reactivity which has broken down under the influence of irradiation.

APPARITION DE VARIANTES DE PHASE, PATHOGÈNES ET APATHOGÈNES, CHEZ LA *SHIGELLA FLEXNERI 2a* SOUS L'ACTION DU BACTÉRIOPHAGE ET DU SÉRUM HÉTÉROLOGUE

par

G. Istrati, T. Meitert et C. Ciufeco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Dysenterie)

— Manuscrit reçu le 1 juin 1960 —

On connaît de la littérature l'action que les sérums agglutinants anti-Flexner (ou même le sérum normal de lapin) exercent sur les souches correspondantes de type et nommément celle de les faire passer de la phase A en phase B ou C (1.2.), mais on ignore si ces sérums ont un rôle modificateur sur le facteur pathogène. Il est connu que les bactériophages ont, en général, le pouvoir de déterminer la production de différentes variantes à partir des souches sur lesquelles ils ont une action lytique (3).

Dans une note antérieure (4) l'un de nous a constaté chez un sujet infecté accidentellement, lors de la préparation d'un vaccin, que certains clones de bacilles dysentériques, isolés des coprocultures, avaient perdu en même temps que le lysotype de la souche infectante l'antigène de type (II), devenant variante Y, ce qui expliquerait éventuellement la modification du lysotype.

Attendu que le contenu intestinal comprend beaucoup de souches de bacilles para coli ou coli-lysogènes, nous nous sommes demandés si sous l'action des bactériophages la *Sh. flexneri* 2a ne pouvait se transformer en variante Y et même en variantes, qui passeraient par la suite de la phase B en phase C ou D, de manière à ne plus être reconnues par les sérums agglutinants, dont nous disposons.

Nous nous sommes également demandés si une souche de type 2a, en contact avec un sérum agglutinant d'un autre type, — soit le type 6 — ne perd son action pathogène pour l'œil du cobaye, prouvant de cette manière que le facteur pathogène des souches *Sh. flexneri* n'est pas un facteur de type, mais d'espèce.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

— 5 souches de *Sh. flexneri* 2a (29940, 29934, 29828, 12458, 12222), dont les premières 3 souches contiennent les antigènes II et 3, 4, la souche 12458 seulement l'antigène de type II et la souche 12222 l'antigène 10 et celui du type II en voie de disparition (+).

— Le set de phages antidysentériques de A à M (5).

— La trousse complète de sérums anti-*Shigella flexneri*, plus le sérum de groupe 10(6,7).
— Sérum normal de lapin
— Milieu sélectif avec bile sèche (ISTRATI-MEITERT)
— Cobayes de 250—350 g.
— On a utilisé les techniques classiques d'agglutination sur lame et adsorption (CASTELLANI) ainsi que le test SÉRINY (8). La sensibilité aux phages a été testée selon le procédé habituel en boîte Petri avec gélose 2%.

RÉSULTATS

Des aires de lyse confluente des systémes — *Sh. flexneri 2a* — phages A et K étudiés on a isolé quelques colonies résistantes. Ces colonies ont été repiquées sur boîtes Petri avec milieu de bile sèche ou avec gélose 2% et contrôlées du point de vue réactions biochimiques et de leur sensibilité au set de phages.

I. *a)* De l'aire de lyse du système *Sh. flexneri* No. 29940 — phage K — on a isolé, dans un premier essai, des clones qui dans la grande majorité ont perdu l'antigène de type, conservant, sur lame, une faible agglutinabilité avec le sérum de groupe 3, 4 et devenant faiblement agglutinables pour le sérum 10. Certains de ces clones étalés sur la conjonctive du cobaye n'ont pas donné de maladie caractéristique (test SÉRENY). La plupart des clones (20%) qui agglutinaient encore avec le sérum du type II, agglutinaient tardivement (++). Un clone qui agglutinait promptement avec le sérum de type a présenté le test de SÉRENY faible et tardif (15 jours).

b) Répétant sur une autre aire de lyse l'isolement de 8 colonies résistantes, on a obtenu 8 clones formés de colonies frangées, contaminées par le phage. Tous ces clones ont très bien agglutiné avec le sérum de type II et 3,4 mais pas avec le sérum 10. Les passages effectués (de la masse et pas d'une colonie isolée) à partir de 4 clones ont donné 4 autres clones dont un seul a agglutiné avec les sérums de type II et 3, 4, les autres n'agglutinant que très faiblement ou pas du tout, avec ces sérums, mais agglutinant faiblement avec le sérum 10 (Tableau I).

Tableau I

No. du clone	Sérum II	Sérum 3,4	Sérum 10
5	—	±	—
6	—	+ ±	+
7	0	0	±
8	+ + + +	+ + +	0

Ainsi, les clones porteurs de phages, qui agglutinaient très bien avec le sérum de type et de groupe, mais non avec le sérum 10, ont perdu, après un nouveau passage complètement ou presque complètement les antigènes spécifiques de groupe et type, esquissant l'élaboration d'un nouvel antigène: l'antigène 10. Les phages qui étaient à la surface des germes ont influencé, au second passage, le métabolisme de la nouvelle génération de germes les modifiant profondément et déterminant un changement dans l'élaboration des antigènes.

Le clone 7 étalé sur la conjonctive du cobaye n'a pas produit de maladie caractéristique et ni même la moindre réaction.

II. *a)* De l'aire de lyse du système *Sh. flexneri 2a* No. 29934 — phage K on a isolé des colonies résistantes, qui ont conduit à des clones qui ont perdu leur

gglutinabilité pour les sérums de type II et groupe 3, 4, agglutinant seulement vec le sérum poly-Flexner. Ces clones sont devenus apathogènes pour l'œil u cobaye.

b) Lors d'un autre isolement de colonies résistantes, on a obtenu 8 clones, ont la majorité des colonies frangées. Tous ces clones agglutinaient fortement vec les sérums II et 3, 4, de même que la souche 29940 (expérience Ib); de clones on a effectué des passages sur gélose (de la masse et non d'une colonie solée). Dans cette expérience aussi, la majorité des clones résultés de ce passage 'ont plus agglutiné avec le sérum II et 3,4, mais avec le sérum poly-Flexner; uelques uns ont agglutiné faiblement avec le sérum 10 (+ tardif).

Ainsi, les phages portés par les germes, au premier passage, n'ont pas nfluencé l'élaboration de l'antigène II et 3,4, mais l'ont profondément affecté près un nouveau passage sur gélose.

De 4 colonies non-frangées, mais à contour circulaire net et dont l'aire ne possédait aucune trace de lyse, on a fait des repiquages sur gélose. Des 4 clones obtenus, 3 seulement ont agglutiné avec le sérum de type II et 3,4, le 4-e n'agglutinant qu'avec le sérum 10 (agglutination intense ++++), passant en phase C (Tableau II).

Tableau II

No. du clone	Sérum II	Sérum 3,4	Sérum 10	Pathogénité
1	++++	++++	0	+2 jours
2	++++	++++	0	—
3	++++	++++	0	—
4	0	0	++++	+5 jours

Les clones 1 et 4, inoculés aux cobayes, ont déterminé une maladie caractéristique le second et respectivement le 5-e jour.

La souche obtenue de la conjonctive du cobaye infecté avec le clone No. 4 agglutine non seulement avec le sérum 10, mais aussi avec le sérum de groupe 3,4, donc la phase B—C; le clone No. 4 revient vers la phase B, conservant l'antigène 10 acquis avant passage sur cobaye.

III. De l'aire de lyse du système *Sh. flexneri 2a* No. 29828 — phage K on a repiqué sur gélose 4 colonies résistantes. Des 4 clones obtenus: 4 n'agglutinent plus avec le sérum II, mais 2 agglutinent encore avec le sérum 3,4 et avec le sérum 10 (la souche originale n'a pas l'antigène 10) passant donc en phase B—C, 2 autres n'agglutinent pas avec le sérum 3,4, mais faiblement et tardivement avec le sérum 10. On constate donc que la souche 29828, sous l'action du phage B, a produit des variantes en phase B—C et C.

IV. De l'aire de lyse du système *Sh. flexneri 2a* 12548 — phage K on a repiqué 2 colonies résistantes. Les clones résistants n'agglutinent pas avec les sérums Flexner polyvalents, II et 3,4, mais seulement avec le sérum 5 et très faiblement avec le sérum 10. Le sérum V a été préparé avec la souche G541, qui contient le facteur antigénique 10, présent seulement chez quelques-unes des souches de *Sh. flexneri* type 5. Un des clones a été étalé sur la conjonctive d'un cobaye, sans provoquer la maladie caractéristique.

V. De l'aire de lyse du système *Sh. flexneri 2a* 12222 — phages A et K 12222, on a repiqué par 2 colonies résistantes. Les 4 clones obtenus n'agglutinent plus avec le sérum de type II ou 3,4, agglutinant, par contre (++++) avec le sérum V. De ces clones, un agglutine bien avec le sérum poly-flexner

(+++), un faiblement, et les deux autres pas du tout. Le clone qui agglutine avec le sérum poly-Flexner et avec le sérum V continue à agglutiner, ainsi que la souche originale avec le sérum 10. Dans ce cas, les souches ont passé en phase C et D.

VI. Un mélange en parties égales (4 ml) de bactériophage K et bouillon nutritif a été inoculé avec une anse d'une culture de 2 heures (en bouillon) de *Sh flexneri.* No. 29934. Incubation à 37°, effectuant ensuite des passages (une anse) sur boîtes Petri avec milieu ISTRATI-MEITERT après 2 heures, 3, 4, 6, 10 et 17 jours, avec les résultats suivants:

a) *passage sur milieu à bile sèche après 2 heures* de contact avec le phage à 37°: culture qui agglutine intensivement avec les sérums II et 3,4. De 10 colonies isolées de cette culture, seulement 6 clones obtenus agglutinent avec le sérum II et 3,4, les 4 autres n'agglutinent avec aucun de ces sérums, mais faiblement et tardivement avec le sérum Flexner polyvalent (++) et très faiblement avec le sérum 10. Une des souches qui agglutinait avec le sérum II et 3,4, inoculée au cobaye, a donné le test SÉRENY positif au bout de 3 jours d'incubation, alors qu'une autre souche en phase C est devenue apathogène;

b) *passage après 2 jours :* culture qui agglutinait fortement avec le sérum II et 3,4; 10 colonies provenant de cette dernière ont donné des clones agglutinant tous, à l'exception d'un seul, avec le sérum II et 3,4;

c) *passage après 4 jours à 37° :* culture agglutinant fortement avec les sérums II et 3,4, mais en repiquant 6 colonies, un seul des 6 clones résultés a agglutiné fortement avec le sérum II et 3,4, les autres n'agglutinant pas avec le sérum II et très faiblement avec le sérum 3,4, et agglutinant par contre fortement avec le sérum poly-Flexner et le sérum 10 (++++). Cinq clones ont déterminé une kératoconjonctivite chez les cobayes, après incubation de 1—2 jours (Tableau III);

Tableau III

No. du clone	Sérum Poly-Flex.	Sérum II	Sérum 3,4	Sérum 10	Trypaflavine	Sérum phys.	Pathogénité
1	++++	0	+	+++	0	0	+ 2 jours
2	++++	0	±	++++	0	0	+ 1 ,,
3	++++	0	+	++++	0	0	+ 1 ,,
4	++++	0	+	++++	0	0	+ 1 ,,
5	++++	++++	++	0	0	0	+ 2 ,,
6	+- ++	0	+	+++	0	0	—

Les souches obtenues des cobayes ont gardé les mêmes facteurs antigéniques, sans revenir à la variante Y (elles sont restées en phase C);

d) *passage après 6 jours :* culture agglutinant avec le sérum II et 3,4 (faiblement), mais les 10 clones obtenus n'ont pas agglutiné cette fois;

e) *passage après 10 jours :* culture n'agglutinant ni avec le sérum II et ni avec le sérum 3,4. De 8 clones obtenus, aucun n'a agglutiné avec les 2 sérums mais ils ont agglutiné avec le sérum poly-Flexner à différents degrés d'intensité (de + à ++++) et fortement avec le sérum 10, étant tous en phase C. La culture de 10 jours, inoculée aux cobayes, a déterminé après 48 heures une légère sécré-

on avec opacification de la cornée. La culture isolée de la conjonctive, 5 jours près l'infection du cobaye, est restée en phase C;

f) *passage de la souche* 29934, *après 17 jours de contact avec le phage* K *:* btention d'une souche avec les mêmes caractères antigéniques que celle de 10 urs, présentant en plus une pathogénité accentuée après 24 heures d'incubation cobayes).

Toutes les souches des expériences relatées ont perdu, en même temps que facteur spécifique de type et de groupe, aussi leur sensibilité aux 14 phages u set utilisé pour la lysotypie des souches de *Sh. flexneri 2a.*

VII 1) Afin d'établir la dilution qui détermine la production des variantes n phase B, C ou D, on a ensemencé deux dilutions de sérum type VI (1/15 et /30) par une anse d'une culture de *Sh. flexneri 2a* No. 29934 (en bouillon).

Du surnageant des mélanges ensemencés, incubés à 37°, on a fait des passages quotidiens sur gélose ou sur milieu avec bile sèche, en contrôlant ensuite l'agglutination sur lame avec les sérums II, 3,4 et 10.

On n'a pas observé pendant les 4 premiers jours de modifications de l'agglutinabilité vis-à-vis des sérums II ou 3,4.

Après 6 jours on a fait des passages du surnageant sur 2 autres dilutions de érum VI (1/15 et 1/30) continuant les passages quotidiens sur le milieu vec bile.

Après 10 jours, la culture obtenue de la dilution 1/15 n'a plus agglutiné vec le sérum II mais seulement avec le sérum 3,4 et poly-Flexner, comme dans e cas des variantes Y (= phase B), ne donnant pas de kératoconjonctivite. Toutes les cultures résultées de la dilution de sérum 1/30 ont agglutiné normalement.

2) A la suite de ces résultats, on a repris les expériences avec le même sérum anty-Flexner de type VI, mais en dilutions de 1/10 et 1/15 de la même souche 29934. On a fait des passages sur bile sèche (boîtes Petri) après 2 heures, et après 2, 4, 6 et 10 jours à 37°, avec les résultats suivants:

a) *passages de* 2 *heures :* cultures dont chacune a donné 10 clones, qui ont fortement agglutiné avec les sérums II et 3,4;

b) *passages après* 2 *jours à* 37° *:* cultures dont on a isolé des clones (10 et respectivement 8) qui pour la plupart n'agglutinent plus avec les sérums de type II ou 3,4.

Une souche qui n'avait pas perdu l'antigène de type et de groupe, étalée sur la conjonctive d'un cobaye a déterminé une maladie légère (simple sécrétion) après 3 jours d'incubation avec guérison au bout de 8 jours. Une souche, qui avait perdu néanmoins les 2 antigènes, étalée sur la conjonctive d'un seul cobaye n'a point déterminé de maladie;

c) *passages après 4 jours :* des 2 dilutions de sérum par repiquage on a obtenu 7 et respectivement 8 clones. Des 7 clones provenant de la dilution 1/10, 2 ont conservé l'antigène spécifique et de groupe, le reste perdant les 2 antigènes. De 8 clones provenant de la dilution 1/15, 2 clones possédaient les 2 antigènes, 3 ayant seulement l'antigène de groupe 3,4 passant en phase B de la variante Y et le reste de 3 clones n'agglutinaient ni avec le type II ou 3,4 ni avec le sérum Flexner polyvalent, passant dans la phase D. Aucun de ces clones, indifféremment de l'antigène qu'ils possédaient ou du manque d'antigène, n'ont déterminé de maladie chez le cobaye (étalés sur les yeux d'un seul cobaye).

Néanmoins un des clones à antigènes II et 3,4 étalé sur la conjonctive de 5 cobayes, a produit plus tard chez deux d'entre eux un léger larmoiement d'une durée de quelques jours, dont on a cultivé des bacilles dysentériques. L'un des cobayes a montré plus tard une légère opacité de la cornée et l'autre une opacité évidente, guérissant au bout de quelques jours;

d) *passages après 6 et 10 jours :* des 2 dilutions de sérum se sont développées des cultures, qui (prises avec l'anse en masse) n'ont plus agglutiné avec le sérum II ou 3,4, ni avec le sérum poly-Flexner, passant ainsi dans la phase D.

Les passages des ensemencements témoins (dilutions 1/10 de sérum normal de lapin en bouillon nutritif ainsi qu'en bouillon nutritif sans sérum de lapin) après 2, 4, 6, 10 et 17 jours d'incubation à 37° ont donné des clones qui agglutinaient tous avec le sérum de type II et 3,4. Une partie des clones isolés des cultures témoins après 10 et 17 jours, étalés sur la conjonctive des cobayes, ont montré leur pathogénité.

Ces expériences ont prouvé qu'un sérum anti-Flexner d'un autre type que celui étudié peut également influencer la production des variantes de phase B, C ou D et, en plus, imprimer une action d'atténuation du facteur pathogénique.

Dans des travaux ultérieurs nous essaierons d'approfondir cette dernière observation.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Les repiquages de colonies provenant des aires de lyse de quelques phages mis en contact avec certaines souches de *Sh. flexneri 2a*, ont prouvé que les phages anti-paracoli, entraînés sur différentes souches de *Sh. flexneri 2a*, "S" et "R" etc., ont la capacité de modifier profondément le métabolisme des souches lysosensibles de *Sh. flexneri 2a*, au point de les transformer en variantes de phase B, C ou D. Ces souches, même si elles conservent les antigènes spécifiques de type et de groupe, perdent de leur activité pathogène, les souches dépourvues de ces antigènes devenant même apathogènes.

2. Dans certains cas, les passages de colonies résistantes donnent des cultures contenant des phages, avec développement de colonies frangées ou partiellement lysées, qui, du point de vue sérologique, ne se distinguent pas des cultures d'origine. Il suffit néanmoins de les repiquer sur gélose pour qu'elles perdent (le plus souvent) l'antigène spécifique de type, et devenir des variantes Y, passant dans la phase C. Parfois elles perdent tous les antigènes (phase D) ou agglutinent seulement avec le sérum poly-Flexner ou V (anti G541).

3. On observe que, par l'application sur la conjonctive du cobaye, de nombreuses souches ayant passé en phase B ou C continuent à rester pathogènes et que quelques-unes qui ont perdu l'antigène 3,4 l'obtiennent de nouveau par passages sur cobayes (action reversible). Certaines restent toutefois pathogènes, élaborant seulement l'antigène 10 (phase C).

4. Tandis que sur gélose, en dehors de l'élaboration des antigènes, l'action du phage affecte la pathogénité des souches *Sh. flexneri 2a*, comme si la gélose possédait un facteur nocif de cet ordre, dans le milieu avec bouillon nutritif le bactériophage permet la conservation de la pathogénité, bien que les souches passent en phase B ou C.

5. Reste à savoir si l'emploi des bactériophages dans la thérapeutique de la dysenterie bacillaire ne pourrait mener à la réalisation de souches pathogènes

ui ne seraient plus identifiables à l'aide de la trousse habituelle de sérums nti-Flexner. De même, nous nous demandons si de pareilles variantes ne se roduisent pas sous l'influence des phages endogènes de paracoli ou coli dans ntestin de l'homme.

6. Nous supposons que la variante Y, isolée d'un sujet infecté lors de la réparation d'un vaccin anti-Flexner 2a, est apparue sous l'influence d'un phage ndogène.

7. Les expériences effectuées en vue de cultiver une souche de *Sh. flexneri* , en dilution de sérum anti-Flexneri d'un autre type (VI) ont donné des riantes de phase B, C et D (de même que dans le cas d'autres investigateurs ilisant des sérums homologues). On a constaté en plus, que les souches qui ssent dans la phase B, C ou D deviennent apathogènes, et que même les uches qui conservent les antigènes de type et de groupe en contact avec un rum d'un autre type, perdent une grande partie de leur pathogénité.

BIBLIOGRAPHIE

Okabe K. — J. Immunol. 1958, **81**, 285.
Metzger M. et Rudnicka I. — Archiv. Immunol. i Terap. Doswiad. 1957, **5**, 77.
Matsui S. — Japan. J. Microb. 1958, **2**, 153.
Istrati G. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 95.
Istrati G. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 85.
Gorea A. et Meitert T. — Comunic. Soc. St. Medic., 1960, juillet.
Meitert T. et Gorea A. — Comunic. Soc. St. Medic., 1960, juillet.
Séreny B. — Acta Microb. Acad. Scient. Hung., 1955, **2**, 293.
Săsărman A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 309.

ПОЯВЛЕНИЕ ФАЗОВЫХ ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТ *Shigella Flexneri 2a* ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИОФАГА И ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Путём пересева колоний с зоны лизиса нескольких фагов, приведенных в сопри-сновение с некоторыми штаммами *Sh. flexneri* 2a, установлено, что бактериофаги отив кишечной палочки многократно перевиваемые на разных штаммах *Sh. flexneri* 2a (и R) обладают способностью глубоко расшатывать обмен лизочувствительных штам-в *Sh. flexneri* так что эти штаммы превращаются в фазовые варианты B, C или Д. ыделенные с зоны лизиса штаммы, даже если и содержат специфические типовые групповые антигены, теряют частично патогенные свойства, причём штаммы, лишен-ie этих антигенов, становятся совершенно непатогенными. Иногда пересевы устой-вых колоний порождают колонии, идентичные с точки зрения серологии с исход-ими штаммами, но при первом пересеве на агаре дающие фазовые варианты.

При нанесении на конъюнктиву морских свинок, большая часть штаммов пере-дших в B или C — фазу, остаются и в дальнейшем патогенными, а некоторые штаммы, терявшие антиген 3, 4 приобретают вновь этот антиген путём пассирования на рских свинках (обратимое действие).

В то время как на агаре влияние фага отражается как на выработку антигенов, к и на патогенность штаммов *Sh. flexneri* — как будто-бы в агаре присутствовал i фактор вредящий с этой точки зрения — в питательном бульоне бактериофаг не епятствует сохранению патогенности, не смотря на то что штаммы переходят в B и C — фазу.

В течении опытов по выращиванию штамма *Sh. flexneri* 2a в разведении флекс-ровской сыворотки другого типа (IV) получаются непатогенные варианты B, C и -фаз. Установлено также, что даже штаммы ещё сохраняющие типовые и групповые тигены при соприкосновении с сывороткой другого типа, теряют в большой степени тогенность.

DAS AUFTRETEN VON PATHOGENEN UND NICHTPATHOGENEN PHASENVARIANTEN BEI *SH. FLEXNERI* 2a UNTER DER EINWIRKUNG VON BAKTERIOPHAGEN UND VON HETEROLOGEN ANTISERUM

ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Überimpfung von Kolonien aus dem Lysegebiet bestimmter Stämme von *Sh. flexneri* 2a, nach Kontakt mit gewissen Phagen ergab sich, dass Paracoliphagen, die an verschiedene Stämme von *Sh. flexneri* 2a (« S » und« R ») angepasst worden waren, die Fähigkeit besitzen, den Stoffwechsel lysosensibler Stämme von *Sh. flexneri* 2a tiefgehend zu erschüttern, so dass diese Stämme in B, C oder D-Phasenvarianten umgewandelt werden. Die aus dem Lysegebiet isolierten Stämme verlieren ihre pathogenen Eigenschaften selbst wenn sie typen- und gruppenspezifische Antigene besitzen, während die Stämme die diese Antigene nicht enthalten sogar apathogen werden. Manchmal bilden sich aus widerstandsfähigen Kolonien, durch Überpflanzung, Kolonien die ihnen vom serologischen Standpunkt vollkommen gleichen, aber bei der ersten Überimpfung auf Agar Phasenvarianten bilden.

Bei der Einimpfung in die Bindehaut des Meerschweinchens erweisen sich viele der Stämme, die in die B-oder C-Phase übergegangen sind, weiterhin als pathogen, während einige, die das Antigen 3,4 verloren haben es durch Meerschweinchenpassagen wiedergewinnen (reversible Wirkung).

Während auf Nähragar die Phageneinwirkung sowohl die Ausbildung der Antigene, als auch die Pathogenität der Stämme von *Sh. flexneri* 2*a* beeinträchtigt (als ob im Agar ein in diesem Sinne schädlicher Faktor vorhanden wäre), bleibt bei Einwirkung der Bakteriophagen in Nährbouillon die Pathogenität erhalten, obwohl die Stämme in die B-oder C-Phase übergehen.

Bei der Züchtung eines Stammes von *Sh. flexneri* 2*a* in Verdünnungen eines Flexner-Antiserums gegen einen anderen Typus (VI) wurden apathogene B, C- und D-Phasenvarianten erhalten. Es wurde gleichfalls festgestellt, dass auch die Stämme, bei welchen sich die Typen- und Gruppenantigene in Kontakt mit einem anderen Typenserum erhalten, weitgehend ihre Pathogenität verlieren.

THE APPEARANCE OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC PHASE VARIANTS IN *SH. FLEXNERI* 2*a* UNDER THE INFLUENCE OF THE BACTERIOPHAGE AND OF HETEROLOGOUS SERUM

SUMMARY

The subculturing of colonies from the lysed area of some strains of *Sh. flexneri* 2*a* put in contact with certain phages showed paracoli phages which had been adapted to various strains of *Sh. flexneri* 2*a* ("S" and "R") to possess the ability of deeply disturbing the metabolism of lysosensitive strains of *Sh. flexneri* 2*a* which were consequently transformed into B, C or D phase variants. Strains isolated from the lysed area, even when they contained the type and group-specific antigens, lost their pathogenicity, while strains lacking these antigens even became non-pathogenic. Sometimes subculturing of resistant colonies resulted in colonies which were identical with the original ones from the serological point of view but gave rise to phase variants at the first passage on agar.

Following conjunctival inoculation in the guinea-pig, many strains which had passed into phase B or C maintained their pathogenicity, and some of those which had lost antigen 3,4 regained it by guinea-pig passages (reversible action).

Whereas phage action in an agar medium besides impairing antigen formation, interferes with the pathogenicity of *Sh. flexneri* 2*a* strains (as if a harmful factor were present in the agar), in nutrient broth pathogenicity is maintained despite bacteriophagic action although the strains pass into the B or C phases.

During the cultivation of a strain of *Sh. flexneri* 2*a* in dilutions of an anti-Flexner serum against another type (VI), non-pathogenic B, C and D phase variants were obtained. It was likewise that even strains which maintain type- and group-specific antigens when put in contact with serum against another type, lose very much of their pathogenicity.

ECHERCHES SUR UN MILIEU LIQUIDE D'ENRICHISSEMENT OUR LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE

par

Calalb, Alice Saragea et Paula Maximesco avec la collaboration de: Natalia Cioroianu, Ana Popesco, Suzana Popa et Ana Mihăilesco

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » – Service de la Diphtérie et du Laboratoire du Centre Anti-épidémique Régional (SANEPID) de Bucarest).

— Manuscrit reçu le 9 mai 1960 —

Les grandes difficultés rencontrées par le bactériologue dans l'isolement l'identification du bacille diphtérique, aussi bien chez le malade que chez le rteur, nous ont incité à réaliser un schéma d'étude, qui pourrait préciser le agnostic bactériologique de l'espèce du *Corynebacterium diphtheriae* et des types *ravis, mitis, intermedius).*

En même temps que la réalisation de ce schéma, se pose le problème tout ssi important de trouver une méthode qui puisse assurer un pourcentage de sultats positifs aussi proches que possible de la réalité.

Les milieux solides — Loeffler (12), Tsimbalist, Ivanov (18), Conradi-och (5), Anderson (1), Clauberg (4), Gundel-Tietz (9), Danila (6), erman (7), Soucek (16), Folger (cité par Calmette, 3), Sneerson (17), alachnikova (11) — employés au cours des années, malgré leur valeur élective sélective incontestable n'ont pu répondre au désideratum mentionné plus ut, surtout dans certaines situations comme:

1. les infections paucibacillaires, rencontrées surtout chez les porteurs;
2. la fréquence grandissante des souches de *C. diphtheriae* atypiques ncontrées tant chez les porteurs que chez les malades, probablement en liaison ec l'emploi sur grande échelle des antibiotiques, avec installation de l'im-unité active, etc.;
3. l'action antibiotique exercée par la microflore naso-pharyngienne dans s conditions écologiques naturelles.

Ainsi que pour les entérobactériacées, on a essayé pour la diphtérie de ouver différents milieux liquides d'enrichissement qui doivent remplir une rie de conditions et notamment:

— contenir des substances nutritives et des facteurs de croissance en concen-ations optimes afin d'assurer le développement des germes et l'intensification leur métabolisme, surtout lors de la présence des souches de *B. diphtériques* ypiques;

— inhiber, le plus possible, la croissance et la multiplication de la flore microbienne associée, éviter les phénomènes d'antibiose imprimés au bacille diphtérique, influençant ainsi le rapport numérique en faveur de ce dernier.

Ainsi, Manzello cité par Calmette (3), Gross (8), Kroeger (10), Primavesi (14) réalisent des milieux liquides d'enrichissement selon le principe des milieux solides différentiels (Clauberg, Gundel-Tietz), obtenant un plus grand pourcentage de cultures positives.

Pergola (13) revient sur la valeur d'un milieu liquide d'enrichissement qu'il désigne s.u.t., à base de jaune d'oeuf, sérum de boeuf, solution saline et une faible concentration de tellurite de potassium. Après incubation du tampon avec l'exsudat pharyngien dans ce milieu liquide d'enrichissement pendant quelques heures, il ensemence le tampon sur le même milieu, mais coagulé, et obtient de bons résultats, surtout en ce qui concerne le dépistage des porteurs de bacilles diphtériques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Observant que les bacilles diphtériques ont un développement luxuriant sur le milieu Dorset, utilisé dans la Section de diphtérie pour le test de la phosphatase, nous avons préparé et expérimenté une série de 6 milieux d'enrichissement liquides, tous à base de substances nutritives (jaune d'oeuf, sérum de boeuf, bouillon glucosé), de facteurs de croissance (cystine) et différentes substances inhibitrices (tellurite de potassium, sélénite de sodium, azoture de sodium, crystal violet) en concentrations variées.

Le pourcentage le plus élevé d'isolements positifs a été obtenu avec le milieu o.c.s.t. (oeuf — cystine - sérum — tellurite) selon la formule suivante:

Sérum de boeuf	150 ml
Bouillon glucosé 2%	50 ml
Jaune d'oeuf	2
Tellurite de potassium sol. 2%	20 ml
Cystine, sol. 10%	2,2 ml

On choisit des oeufs frais, bien lavés à l'eau et au savon et on les introduit dans de l'alcool (70°) pendant une heure. On fixe l'oeuf sur un support, on essuie le pôle supérieur avec de la teinture d'iode, on le perfore avec un stylet ou une aiguille stérile(par des mouvements en vrille) et on l'enlève ensuite à l'aide des ciseaux et d'une pince stériles; on flambe le bord de l'ouverture et on écoule le blanc d'oeuf, en renversant le jaune dans un flacon avec perles, prévu d'un entonnoir — le tout stérilisé au préalable. On peut récolter par 2 jaunes d'oeufs dans le même flacon. On enlève l'entonnoir, en bouchant le flacon de manière stérile, on agite bien le contenu et on contrôle la stérilité sur milieux habituels (bouillon, gélose, gélose-sang et un milieu anaérobie). Les flacons sont conservés jusqu'au lendemain au frigidaire. Si l'épreuve de stérilité est bonne, on procède de manière stérile au mélange des substances dans les quantités et l'ordre indiqués plus haut. Les solutions de tellurite de potassium et de cystine se préparent comme pour le milieu de Gundel-Tietz. La stérilité du milieu final est contrôlée sur les milieux de culture usuels cités plus haut; il peut être conservé dans de bonnes conditions, au frigidaire, jusqu'à 2 mois. Au moment de son emploi,

milieu est réparti en quantités de 2 à 3 ml dans l'éprouvette contenant le tampon ec l'exsudat qui, de cette manière, sera couvert de liquide.

Technique de travail. Le tampon récolté, plongé dans le milieu d'enrichissment, est incubé à 37° pendant 14—18 heures. Dans les cas moins urgents, n peut le garder à l'étuve pendant un intervalle plus long (24—48 heures). ne incubation prolongée présente l'avantage d'une inhibition plus marquée la flore associée.

Après l'incubation des tampons dans les milieux d'enrichissement O.C.S.T. n constate parfois, dans les cas positifs, un noircissement du sédiment, ainsi ue l'apparition de points noirs sur le tampon, dus à la réduction du tellurite potassium. Cet aspect n'est pas strictement spécifique pour le bacille diphrique et peut être produit aussi par d'autres germes (entérocoques) ou quelques spèces de champignons. Le tampon est ensuite ensemencé sur les milieux olides sélectifs et électifs, prévus dans le schéma du diagnostic de la diphtérie; our les malades on emploiera les milieux LOEFFLER, gélose-sang, GUNDEL-IETZ et CLAUBERG.

Les opérations de dépistage des porteurs, dans les collectivités, comportent nombreux examens; en vue de la simplification des manoeuvres, de très ons résultats sont obtenus si le tampon après incubation dans le milieu O.C.S.T. — ventuellement prolongée — est ensemencé seulement sur boîtes à gélose-sang GUNDEL-TIETZ, ou bien seulement sur milieu GUNDEL-TIETZ, en vue 'obtenir des colonies isolées qui seront étudiées plus loin.

★

Ce milieu a été utilisé aussi bien dans des conditions expérimentales de aboratoire que sur le terrain (dans une série de 5 foyers épidémiques de la région e B).

Dans le laboratoire on a recherché l'action du milieu O.C.S.T. et des autres variantes sur un mélange de germes: b. diphtérique, streptocoque hémoytique et viridans, méningocoque, microcoque catarrhal, entérocoque, taphylocoque.

Par l'emploi combiné de ce milieu avec de la gélose-sang ou milieux GUNDEL-IETZ et CLAUBERG, on constate après l'ensemencement du tampon du milieu quide sur gélose-sang, l'inhibition du développement pour la majorité des ermes, sauf les bacilles diphtériques et de rares colonies de staphylocoque et ntérocoque.

Sur le milieu CLAUBERG se développent le b. diphtérique et les entérocoques.

Sur le milieu GUNDEL-TIETZ: le b. diphtérique croît abondamment, alors ue la flore associée est réduite à de rares colonies d'entérocoques, qui se développent tardivement.

Afin d'établir la valeur du milieu O.C.S.T. dans les conditions du terrain, n a utilisé des tampons récoltés de 195 contacts et 34 malades ou provenant le différents foyers.

De 195 contacts:

a) 56 tampons, prélevés en double exemplaire, provenaient d'individus l'une collectivité fermée; les tampons ont été ensemencés parallèlement sur élose-sang et sur milieu O.C.S.T. et ultérieurement sur milieux solides.

b) 139 autres tampons, prélevés en triple exemplaire, provenant d'individus d'une collectivité ouverte, ont été ensemencés: une série directement sur gélose-sang, la seconde après préalable incubation en bouillon et la troisième après incubation dans les milieux O.C.S.T., sur milieux solides.

RÉSULTATS

Groupe a

— par cultures directes sur gélose-sang, on a isolé, dans 12 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 21,40%);

— par le procédé combiné, milieu O.C.S.T. — milieux solides, on a isolé, dans 18 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 32,10%).

Groupe b

— par cultures directes sur gélose-sang, on a isolé dans 20 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 14,30%);

— par le procédé combiné, bouillon-milieux solides, on a isolé, dans 4 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 2,80%);

— par le procédé combiné, O.C.S.T. — milieux solides, on a isolé, dans 58 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 41,70%).

Chez 34 malades et suspects, on a récolté 3 tampons de chacun:

— par cultures directes sur gélose-sang, on a isolé, dans 9 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 26,47%);

— par procédé combiné, bouillon — milieux solides, on a isolé, dans 2 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 5,85%);

— par procédé combiné, milieu O.C.S.T. — milieux solides, on a isolé, dans 16 cas, des bacilles diphtériques (résultats positifs: 47,05%).

Nous avons choisi comme milieu solide de comparaison pour le milieu O.C.S.T. la gélose-sang en boîte Petri et non le milieu LOEFFLER en tube, vu que, selon notre expérience-les possibilités d'isolement sur ces deux milieux, tout en étant comparativement égales dans les conditions du terrain-l'ensemencement par épuisement, pour l'obtention de colonies isolées sur 3—4 tubes avec milieu LOEFFLER pour chaque tampon à part, entrave et retarde les opérations de diagnostic.

A part ces examens comparatifs, le laboratoire du Centre anti-épidémique régional de Bucarest a effectué, au cours de 5—6 mois, 1843 récoltes pour le dépistage des porteurs de quelques foyers de la région de B; employant le milieu O.C.S.T., 280 résultats positifs ont été obtenus (15,19%). On a constaté des différences procentuelles et une facilité remarquable pour ce qui est des possibilités d'isolement et d'identification des bacilles diphtériques en comparaison avec les méthodes antérieures.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Par son contenu en sérum de boeuf, bouillon glucosé, jaune d'oeuf et cystine, le milieu O.C.S.T. augmente numériquement et intensifie le métabolisme du bacille diphtérique; les souches isolées après préalables enrichissements sur ce milieu, donnent des colonies luxuriantes sur milieux solides, qui s'identifient facilement macro- et microscopiquement. Dans le cas des porteurs, chez lesquels, en général, les souches de *C. diphtheriae* présentent un métabolisme moins actif,

culture dans ce milieu imprime aux germes une capacité fermentative beaucoup s rapide et intense, des possibilités de réduction du tellurite plus accentuées un développement plus luxuriant.

Grâce à ces propriétés, le milieu contribue à l'isolement et à la mise en idence des souches atypiques de *C. diphtheriae* que l'on rencontre de plus en s fréquemment ces dernières années.

2. Le milieu O.C.S.T. présente une forte action inhibitrice sur un nombre vé d'espèces microbiennes qui se trouvent dans la flore naso-pharyngienne, rtout si l'enrichissement est suivi d'isolements sur milieu GUNDEL-TIETZ.

3. L'emploi du milieu liquide d'enrichissement retarde de 24 heures le sultat de l'examen bactériologique.

Ce retard ne compte pas lorsqu'il s'agit de dépister les germes des porteurs, uls les avantages de la méthode restent à être pris en considération: hausse u pourcentage des résultats positifs (11-27%) et facilité considérable des procédés isolement.

Vu le caractère urgent de l'examen bactériologique chez les malades les suspects de diphtérie, il est recommandable de faire simultanément du emier tampon avec exsudat des ensemencements sur milieux solides usuels *oeffler*, gélose-sang) et du second tampon des ensemencements d'abord sur s milieux liquides d'enrichissement O.C.S.T. et puis sur milieux solides. Dans cas où la première méthode ne donne pas de résultats satisfaisants, l'utilisation e la méthode d'enrichissement, qui donne un pourcentage plus élevé de diagstics positifs, permet le traitement adéquat des malades respectifs.

4. L'ensemble des propriétés du milieu d'enrichissement O.C.S.T. nous autose à le recommander aussi bien pour le diagnostic bactériologique de la diphtérie, ue pour le dépistage en masse des porteurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON J. S., HAPPOLD F. C., MCLEOD J. W. et THOMPSON J. C. — J. Path. a. Bact., 1931, **34,** 667 et 1933, **36,** 169.
2. BRUCER J. — Med. Doszwiadc., 1955, **2,** 15.
3. CALMETTE A., BOQUET A. et NEGRE L. — Manuel technique de Microbiologie et des Sérums, 449, Paris, Masson, 1958.
4. CLAUBERG K. W. — Zbltt. f. Bakt., Orig. I., 1935, **134,** 271 et 1936, **135,** 529.
5. CONRADI H. et TROCH P. — Münch. Med. Wschrft., 1912, **59,** 1612.
6. DANILA P. — Rev. Microb., Epidem., Imunol., 1957, **2,** 19.
7. FAERMAN N. N., MIKHAILOVA A. M. et VASILIEVA Z. P. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., suppl., 1957, 45.
8. GROSS H. — Zbltt. f. Bakt. Orig. I., 1951—52, **157,** 562.
9. GUNDEL-TIETZ. — Zschrft. f. Hyg., 1934, **116,** 439.
10. KROEGER E. — Zschrft. f. Hyg., 1951, **132,** 50 et Klin. Wschrft., 1951, **5,** 6.
11. KALACHNIKOVA A., TALLAIKO-BELAIA N. K. et GUSEVA A. B. — Sovetsk. Zdravoohr., 1954, **8,** 16.
12. LOEFFLER F. — Mitt. Reichsgesund. Amt., 1844, **2,** 421 et Zbltt. f. Bakt. Orig. I., 1890 **7,** 528.
13. PERGOLA M. — Ann. d'Igiene, 1922, **32,** 629 et Rend. Ist. Sup. Sanità, 1955, **18,** 286.
14. PRIMAVESI K. A. — Deutsche Med. Wschrft., 1955, **80,** 1045.
15. SCHURMANN W. et HAJOS E. — Deutsche Med. Wschrft., 1913, **39,** 786.
16. SOUCEK A. et NOVOTNY P. — J. Mikrob., Epidem., Immunol., Prague, 1959, **8,** 217.
17. SNEERSON P. S. — Lab. Delo, 1956, **4,** 30.
18. TSIMBALIST D. F. et IVANOV A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957. No. 11, 148.

ИЗУЧЕНИЕ ОБОГАТИТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Исходя из больших затруднений, встречаемых лабораторными врачами при бактериологической диагностике дифтерии, как у больных, так и носителей, и основываясь на наблюдении факта, что желток яйца способствует обильному развитию дифтерийной палочки, авторы создали и экспериментировали жидкую среду, содержащую бульон, яйцо, бычью сыворотку, цистин и телурит калия.

Сходную среду, но содерживающую меньше количество факторов роста, экспериментировал Пергола (1922—1955).

После погружения в эту среду и инкубирования в течении 14—16 часов, при 37°, тампон разгружается на общепринятых элективных или дифференциальных твердых средах (Леффлера, кровяной агар, Гундель—Тиц, Клауберг).

Исследование 2072 тампонов при помощи данного способа установило повышение процента положительных находок, у носителей на 11—27% и у больных на 21%.

Оказывая сильное задерживающее действие на большое количество микробных видов, присутствующих в глоточно-носовой флоре и способствуя обильному развитию дифтерийной палочки, описанная среда облегчает в значительной степени работу местных лабораторий, в особенности при массовых работах по выявлению носителей дифтерийной палочки.

При всем том что у больных положительная диагностика задерживается на 14—16 часов по сравнению с прямым способом на твердых средах, преимущество, сказывающееся в увеличении процента положительных результатов, дает возможность авторам рекомендовать применение в целях диагностики дифтерии у больных, как способа прямого посева на твердых средах, так и жидкой среды для обогащения.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINEN FLÜSSIGEN ANREICHERUNGSNÄHRBODEN ZUR BAKTERIOLOGISCHEN DIAGNOSE DER DIPHTHERIE

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von den grossen Schwierigkeiten, welchen die bakteriologischen Diagnose der Diphtherie, sowohl bei Trägern als auch bei Pazienten im Laboratorium begegnet, und auf Grund der Beobachtung, dass Eigelb ein sehr üppiges Wachstum der Diphtheriebazillen gestattet, arbeiteten die Verfasser eine Nährflüssigkeit aus, die Fleischbrühe, Ei, Rinderserum, Zystin und Kaliumtellurit enthält.

Ein ähnlicher aber an Wachstumsfaktoren ärmerer Nährboden wurde von PERGOLA ausprobiert (1922—1955).

Nach Versenkung in diese Flüssigkeit und Bebrütung bei 37°C während 14—16 Stunden, werden die Tampons auf die üblichen festen selektiven und Differenzierungsnährböden ausgestrichen (Loeffler, Blutagar, Gundel-Tietz, Clauberg).

Es wurden 2072 Tampons nach diesem Verfahren verarbeitet. Der Prozentsatz positiver Resultate stieg bei Trägern um 11—27% und bei Kranken um 21% an.

Durch die starke hemmende Wirkung auf eine grosse Anzahl von Mikrobenarten, die im Nasen-Rachenraum vorhanden sind und durch das üppige Wachstum des Diphtheriebazillus erleichtert dieser Nährboden die Arbeit im Laboratorium ganz bedeutend, insbesondere wenn es sich um Massenuntersuchungen auf Diphtheriebazillenträger handelt.

Obwohl die positive Diagnose um 14—16 Stunden gegenüber der unmittelbaren Aussaat auf festen Nährböden verspätet wird, ist doch der Vorteil des grösseren Prozentsatzes positiver Diagnosen bedeutend genug um die Autoren zu bestimmen, dieses Verfahren, neben der unmittelbaren Aussaat auf festen Nährböden, bei der Diagnose der Diphtherie bei Kranken anzuempfehlen.

INVESTIGATIONS ON A FLUID ENRICHMENT MEDIUM FOR THE BACTERIOLOGICAL DIAGNOSIS OF DIPHTHERIA

SUMMARY

In view of the great difficulties encountered in the bacteriological laboratory diagnosis of diphtheria in carriers as well as in patients, and on the basis of the fact that egg yolk causes an abundant growth of diphtheria bacilli, the authors have devised and tested a fluid medium containing broth, egg, bovine serum, cystine, and potassium tellurite.

A similar medium which, however, contains fewer growth factors has been tested by ARGOLA (1922—1955).

After immersion in this fluid and incubation at 37°C for a period of 14—16 hours, the swabs are discharged on the common selective and seggregating solid media (Löffler, blood agar, Gundel-Tietz, Clauberg).

A number of 2072 swabs were treated by this method. The percentage rates of positive results were found to increase by 11—27 per cent in carriers and by 21 per cent in patients.

By its strong inhibiting action on many microbial species which are present in the nose and throat and by the considerable enhancement of the growth of diphtheria bacilli this medium greatly facilitates the field work of laboratories, in particular when mass detections of diphtheria bacillus carriers are performed.

Although positive diagnosis in patients is delayed by 14—16 hours as compared to direct seeding on solid media, the advantage resulting from the increased percentage rate of positive diagnoses determines the authors to recommend the use of the fluid enrichment medium, besides direct inoculation on solid media, in the diagnosis of diphtheria in patients.

ONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE DES *KLEBSIELLA*

II. ÉTUDE CHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES ISOLÉS DE DEUX SOUCHES CAPSULÉES ET DE LEURS VARIANTES NON-CAPSULÉES

par

[Cella Barber, Silvia Eustatziou et Angela Andreica (collaborateur technique)

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Biochimie Générale)

— Manuscrit reçu le 17 mars 1960 —

Dans des recherches antérieures (1, 2, 3, 4) on a isolé à partir de *Klebsiella* psulées, par des méthodes différentes, des polysaccharides spécifiques on a établi par des méthodes chimiques et immunologiques leur origine matique.

De deux souches MC56 type I et 52204 type II on a séparé les polysaccharides ar différentes méthodes incluant la technique classique d'extraction des antigènes matiques (Boivin-Mesrobeanu); en même temps on a séparé les polysaccharides tra-cellulaires sécrétés dans le milieu de culture par les mêmes souches. L'homo-énéité immunologique de tous ces polysaccharides a été établie par la réaction double diffusion en gel d'agar entre le sérum immun et les polysaccharides olés par les différentes méthodes.

Par le test d'adsorption des précipitines, effectué selon le modèle de Heidelberger, on a établi l'identité sérologique des polysaccharides étudiés; on a plus obtenu de précipitation entre les sérums immuns saturés par un des olysaccharides utilisé dans l'expérience et n'importe lequel des autres polysac-harides homologues étudiés.

Dans les « réactions capsulaires spécifiques », les sérums immuns saturés ar n'importe lequel des polysaccharides étudiés, n'ont plus produit le gonfle-ent considérable du corps microbien, ainsi qu'il arrivait avec le sérum immun émoin et les germes homologues (3).

On a également établi l'identité chromatographique des polysaccharides olubles, isolés par les différentes méthodes avec les polysaccharides restés étroi-ement liés à la cellule microbienne. Des micrographies électroniques ont illustré stade dans lequel les polysaccharides sortent de la cellule dans la forme haute-ent polymérisée, tels qu'ils se trouvent dans les *Klebsiella* capsulées.

Dans le présent travail, on apporte de nouvelles preuves sur l'existence hez les *Klebsiella* capsulées) d'un seul polysaccharide spécifique, le polysac-haride somatique immunologiquement apparenté, à notre avis, au polysaccharide omatique des variantes non capsulées des mêmes souches.

On rapporte dans cette note les résultats obtenus par l'analyse de deux autres souches capsulées, ainsi que de leurs variantes non-capsulées (52212 et P) apparues spontanément dans les cultures microbiennes de la collection de l'Institut Dr. I. Cantacuzino.

On a analysé comparativement les polysaccharides isolés par la méthode préconisée antérieurement (1) et les polysaccharides séparés par les deux méthodes classiques d'extraction des antigènes somatiques: la méthode à l'acide trichloracétique de BOIVIN-MESROBEANU et la méthode au phénol 45% de WESTPHAL et LUDERITZ pour la séparation des lipopolysaccharides (utilisée surtout pour les *Klebsiella*, par KNOLL (7)).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié deux souches capsulées: 52212 de type E et P de type non-déterminé et les mutantes: 52212 et P étudiées immuno-biologiquement dans la note II (5).

L'extraction des antigènes a toujours été faite à partir de germes acétonés.

L'antigène glucidolipidique a été séparé par acide trichloracétique 10% et le lipopolysaccharide par du phénol 45% à 60°.

La technique employée antérieurement pour l'extraction des polysaccharides (1) à partir des *Klebsiella* capsulées n'a pas donné les mêmes résultats, lorsqu'elle a été appliquée aux mutantes non-capsulées.

Par le traitement au phénol 90% des souches capsulées on obtenait toujours, initialement, une mucoprotéine dont la copule glucidique était constituée de glucose, les substances réductrices du complexe (exprimées en glucose) ne dépassant généralement pas 30%; ce n'est qu'ultérieurement que les polysaccharides spécifiques constitués de plusieurs oses passaient en solution.

Par le traitement au phénol 90% de la mutante non-capsulée 52212, on a obtenu un lipopolysaccharide de composition chimique pareille à celle du lipopolysaccharide isolé par le phénol 45%, mais à un rendement inférieur.

Par le traitement au phénol 90% de la variante non-capsulée P on obtient initialement une nucléoprotéine, le polysaccharide passant dans l'extrait consécutif, mais accompagné d'une quantité importante de nucléoprotéine.

L'analyse chimique des antigènes obtenus, a été effectuée par les techniques classiques courantes: *l'azote* par micro-KJELDHAL, les *glucides* par HAGEDORN-JENSEN, les *acides nucléiques* par précipitation cuivreuse des bases puriniques. Les *lipides* (après 8 heures d'hydrolyse des antigènes au ClH N/1 au bain-marie bouillant) ont été extraits par chloroforme.

La chromatographie a été executée sur papier Whatmann Nos. 1 et 4, utilisant comme liquide d'irrigation le butanol-acide-acétique-eau (40:10:50) et comme révélateur le phtalate d'aniline.

Pour séparer le galactose du glucose on a fait 2—3 irrigations.

Les réactions de double diffusion en gel d'agar selon le modèle D'OUCHTERLONY (8) ont été executées avec les sérums immuns des souches capsulées et des mutantes et les antigènes homologues et hétérologues.

Les détails concernant la préparation des sérums immuns, ainsi que les *précipitations* (Ring-test) des sérums par les antigènes homologues et hétéro-

Fig. 1. — Chromatographie du polysaccharide isolé de *Klebsiella* 52212 « S » par 3 méthodes différentes:
1) Lipopolysaccharide (phénol 90%) ; 2) Lipopolysaccharide (phénol 45%, 60°); 3) Glucidolipide. Constitution: galactose, glucose, ribose, acides uroniques.

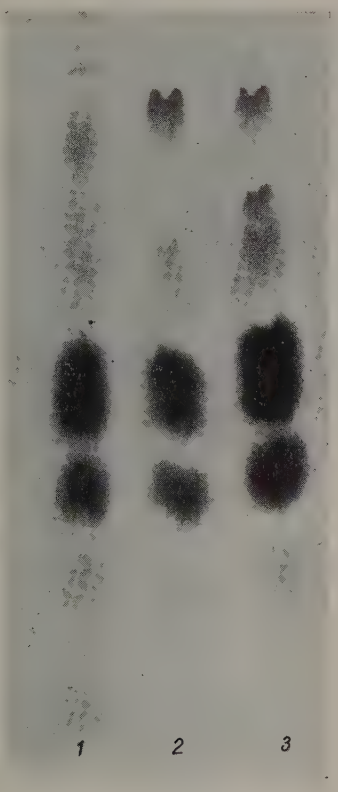


Fig. 2. — Chromatographie du polysaccharide isolé de *Klebsiella* 52212 capsulé, par 3 méthodes différentes:
1) Polymère; 2) Lipopolysaccharide; 3) Glucidolipide
Constitution: galactose, glucose, mannose, xylose, fucose, acides uroniques, glucurone.

logues, font l'objet de la note qui s'occupe de l'étude de la biologie des germes (Note II).

Les réactions d'adsorption des précipitines ont été faites selon le modèle de HEIDELBERGER; les sérums immuns saturés par les antigènes homologues ont été testés avec les antigènes des souches hétérologues.

Fig. 3. — Réactions de diffusion en gel entre l'antisérum P variante et antigènes homologues et hétérologues.
1) Glucidolipide homologue; 2) Lipopolysaccharide homologue; 3) Glucidolipide capsulé; 4) Lipopolysaccharide capsulé

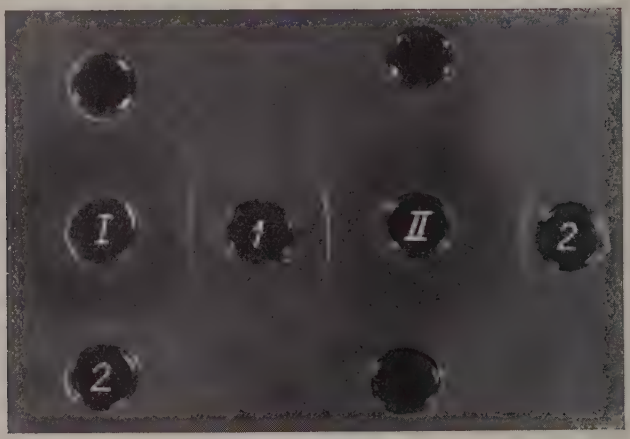


Fig. 4. — Réactions de précipitation en gel entre:
I) l'antisérum 52212 capsulé; II) antisérum 52212 variante; 1) lipopolysaccharide 52212 variante (phénol 90%); 2) polysaccharide polymérisé 52212 capsulé

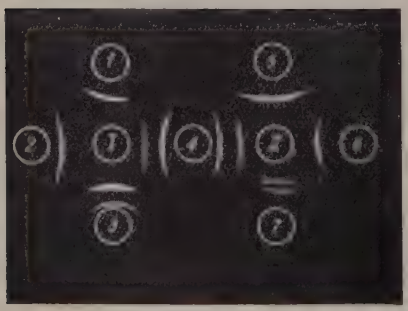


Fig. 5. — Réaction de précipitation en gel entre l'antisérum 52212 mucoïde, l'antisérum 52212 variante et les antigènes homologues et hétérologues. I) Antisérum 52212 mucoïde; II) Antisérum 52212 variante 1) Lipopolysaccharide 52212 mucoïde; 2) Lipopolysaccharide 52212 variante; 3) Glucidolipide 52212 mucoïde; 4) Glucidolipide 52212 variante; 5) Lipopolysaccharide 52212 variante; 6) Lipopolysaccharide 52212 mucoïde; 7) Glucidolipide 52212 mucoïde.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des tableaux qui synthétisent le résultat des analyses chimiques et chromatographiques, ainsi que des précipitations en gel d'agar obtenues avec sérums à antigènes homologues et hétérologues, se détachent les faits suivants:

Les polysaccharides séparés à partir des souches capsulées, par les deux méthodes classiques d'extraction des antigènes somatiques, *sont identiques* aux polysaccharides polymérisés, isolés antérieurement des mêmes *Klebsiella*.

Les rendements de ces polysaccharides varient selon la méthode d'extraction, le plus grand rendement étant obtenu avec le polymère (20—23 g %) qui est le plus facile à extraire; le traitement antérieur des germes au phénol 90%, enlevant une quantité importante de protéines facilite le passage des polysaccharides en solution et la séparation de ces derniers — par centrifugation — du culot bactérien. Dans le cas des *Klebsiella* très mucoïdes (52212) l'antigène glucidolipidique est le plus difficile à séparer; une centrifugation à 16—18.000 t/m est nécessaire pour la séparation des germes.

L'azote des polysaccharides revient dans la plus grande partie aux acides nucléiques qui les impurifient (détermination de bases puriniques); l'antigène glucidolipidique contient la quantité la plus réduite d'acides nucléiques.

Le taux des lipides des complexes polysaccharidiques est généralement réduit et les complexes les plus riches en lipides sont les lipopolysaccharides.

La pauvreté relative en lipides des complexes antigéniques des *Klebsiella* a été signalée dans un travail antérieur (3), dans lequel nous trouvions des chiffres réduits de lipides pour tous les antigènes (même extracellulaires) isolés de deux souches différentes.

Les substances réductrices (exprimées en glucose) des polysaccharides isolés par les trois méthodes sont pratiquement les mêmes, avec des valeurs plus élevées pour les polymères, qui sont aussi les plus pauvres en azote.

Les oses qui constituent ces polysaccharides sont les mêmes dans tous les antigènes, indifféremment de la méthode d'extraction; les polysaccharides isolés de la souche 52212 sont extrêmement riches en acides uroniques et contiennent du galactose, glucose, mannose, fucose et xylose. Le polysaccharide de la souche capsulée P est constitué de galactose, glucose, mannose, xylose et acides uroniques.

En ce qui concerne les mutantes non-capsulées des souches étudiées (v. tabl. I) aussi bien dans le cas de la *Klebsiella* P que dans celui de la souche 52212, les antigènes obtenus diffèrent, tant par leur composition que par leur rendement. Néanmoins la parenté immunologique des souches d'origine et de leurs variantes ne semble pas affectée par les différences concernant la quantité et la composition des antigènes extraits; la constitution chimique, elle même, des germes desquels ces antigènes ont été extraits présente des différences marquées.

Alors que les souches mucoïdes ont une remarquable richesse en glucides (33—35 g%), les mutantes non-mucoïdes ont seulement 9,5—10 g% pour la souche P et 13—14 g% pour la souche 52212. Tel qu'il ressort du tableau, le rendement en antigènes des mutantes est environ 3 fois plus petit que celui des souches d'origine, capsulées. Le polysaccharide dans les complexes antigéniques des mutantes est beaucoup plus réduit, le plus pauvre en polysaccharide étant l'antigène glucidolipidique. Par contre, les antigènes des mutantes sont

Tableau I

	Substances réductrices des germes totaux (exprimées en glucose) g%	Polymère (après traitement des germes avec phénol 90%)				Antigène glucidolipidique				Lipopolysaccharide (Phénol 45%)				Oses qui entrent dans la constitution des polysaccharides
		Rendement g%	Lipides g%	Azote g%	Glucides g%	Rendement g%	Lipides g%	Azote g%	Glucides g%	Rendement g%	Lipides g%	Azote g%	Glucides g%	
Kl. Panduri capsulée	35,0	22,0	3,0	3,4	57,0	20,0	2,9	4,2	50,0	12,7	4,5	4,36	50,0	galactose, glucose, mannose, xylose, ribose, acides uroniques
Kl. Panduri «S»	10,4	5,4	nucléoprotéine + polysaccharide	8,1	35,0	5,0	4,5	5,2	27,0	6,6	7,6	4,3	33,0	galactose, glucose, ribose, acides uroniques
Kl. 52212 capsulée	33,0	23,0	1,6	3,6	64,1	22,0	2,3	4,1	45,0	11,0	2,7	3,86	49,0	galactose, glucose, mannose, xylose, fucose, ribose, acides uroniques glucurone, galacturone
Kl. 52212 «S»	14,6	6,0	nucléoprotéine	—	—	7,7	3,0	5,15	25,0	11,8	4,7	4,1	30,0	galactose, glucose, ribose, acides uroniques

lus riches en lipides que ceux des souches capsulées; le lipopolysaccharide est lus riche en lipides que l'antigène glucidolipidique.

Le lipopolysaccharide isolé à l'aide du phénol 90% de la mutante 52212 st semblable à celui isolé de la même souche par le phénol à 45% (60°); dans ertains cas, le lipopolysaccharide isolé par le phénol 90% était plus riche en pides que les autres lipopolysaccharides, mais son rendement a toujours été uible (1.5—2 g %).

Le rôle important des lipides dans les complexes antigéniques a surtout té étudié par Westphall (11). L'auteur a prouvé que la fraction lipidique est ssentielle pour l'effet endotoxique et que c'est elle qui porte les groupements ctifs endotoxiques.

Knoll (7) dans les travaux concernant les antigènes de *Klebsiella* affirme ue les lipopolysaccharides endogènes diffèrent des polysaccharides capsulaires ar un facteur pyrogénique qui est le lipide lié au polysaccharide. Cet auteur econnaît que le polysaccharide reşte le seul facteur responsable de la spécifiité. Or, dans le cas des *Klebsiella* le polysaccharide spécifique est le même, ndifféremment s'il est isolé des germes ou bien sécrété par ces germes dans le nilieu de culture.

Dans un travail antérieur (3), où nous utilisions des polysaccharides extracellulaires sécrétés dans les milieux de culture par deux souches (52204 et MC56) lifférentes, nous avons vu que ces polysaccharides sont plus pauvres en lipides ue ceux extraits des germes cultivés sur le même milieu, mais que leur compoıence en oses est la même; une plus grande différence dans la constitution des olysaccharides a été observée en fonction du milieu de culture utilisé.

D'ailleurs, le test d'adsorption des précipitines prouvait l'identité des olysaccharides; le sérum immun saturé par le polysaccharide extracellulaire ne précipitait plus avec le polysaccharide isolé des germes (Tableau II).

Tableau II

Réaction d'adsorbtion des précipitines du sérum anti-Klebsiella 52212 capsulé

Antigènes	Sérum non-absorbé	Sérum absorbé avec Pz. Polymère	Sérum absorbé avec Pz du glucidolipide	Sérum absorbé avec Pz du lipopolysaccharide
Polysaccharide polymérisé	+++ D	—	—	—
Polysaccharide du glucidolipide	+++ D	—	—	—
Polysaccharide du lipopolysaccharide	+++ D	—	—	—

Des résultats identiques ont été obtenus dans le présent travail en utilisant soit le polysaccharide de l'antigène glucidolipidique, soit le polysaccharide polymérisé; le sérum immun saturé par n'importe lequel de ces polysaccharides ne précipite plus avec un autre polysaccharide du même type.

La position exacte du lipopolysaccharide actif dans l'architecture de la cellule bactérienne est une des préoccupations importantes des travaux récents (9).

Carey et Baron (6) essayant de démontrer par voie sérologique la présence d'antigènes différents dans les parois cellulaires, dans les protoplastes ou les membranes protoplastiques, confirment la présence des antigènes somatiques dans toutes ces formations

Ces résultats sont les seuls, à notre avis, qui permettent de donner des explications satisfaisantes à certains faits, qui autrement paraîtraient contradictoires.

Dans des travaux plus anciens Gosling (13), étudiant la variabilité des bactéries capsulées du sclérome, a été surpris du fait qu'il isolait un agglutinogène commun au type capsulé et à la variante non-capsulée, vu qu'il considérait l'agglutinogène presque identique au polysaccharide capsulaire.

Barbara Read et coll. (9), reprenant les travaux de Gosling avec des *Klebsiella* capsulées et des variantes qui ont perdu leur capsule, essayent d'expliquer le fait de l'agglutination des germes décapsulés par un antisérum capsulé, l'attribuant à la présence d'un anticorps produit par les couches sous-capsulaires.

En réalité, dans ces cas, tout comme dans celui des mutantes étudiées par nous, les antigènes sont communs aux souches capsulées et à leurs mutantes non-capsulées; seule la quantité d'antigène et surtout le degré de solubilité de ces antigènes varient avec les liquides utilisés pour leur extraction.

Les très grandes quantités de polysaccharide polymérisé (23 g %) ou d'antigène glucidolipidique qui peuvent être isolées des *Klebsiella* capsulées, comme nous l'avons déjà affirmé, ne peuvent résider dans la capsule. Nos micrographies électroniques nous ont permis de confirmer ce fait. D'ailleurs Willey et Sherp, expérimentant avec des polysaccharides capsulaires très purifiés des colibacilles, constatent que, malgré la purification, ces polysaccharides contiennent des antigènes O (12).

Les résultats obtenus par nous, prouvent que le *polysaccharide spécifique*, modifié dans le cas des mutantes, du point de vue constitution chimique conserve sa spécificité sérologique et qu'il *est commun* aux souches capsulées et à leurs mutantes non-capsulées.

Les recherches immunochimiques de Eriksen et Henriksen (14) ont prouvé, ainsi que celles d'autres auteurs, des relations sérologiques entre les types A et E, obtenant de même un type intermédiaire AE. L'essai de trouver une corrélation entre la composition chimique et la réactivité croisée, n'a pas donné de résultats concluants. Le polysaccharide de chacune des souches étudiées contient 4 monosaccharides: *le galactose*, commun à tous les types étudiés, *le fucose*, commun seulement aux types A et E, *le mannose*, commun aux types AE et E, et *le glucose* se trouvant aussi bien dans les types A que E. *L'acide uronique* est présent dans tous les types et en quantités approximativement égales; il est donc peu probable, selon l'avis des auteurs, qu'il soit responsable de la réaction croisée entre les 3 types apparentés.

Selon nos recherches, les réactions de précipitation croisées et celles de diffusion en gel d'agar prouvent également que, malgré la modification du polysaccharide des variantes, du point de vue constitution chimique, (perte du mannose et du xylose dans le cas de la souche P, du mannose, xylose, fucose et d'une bonne partie de la quantité d'acides uroniques, dans le cas de la souche 52212) le polysaccharide réagit immunologiquement aussi bien avec la souche homologue qu'avec la souche capsulée. La mutante de la souche 52212 est d'ailleurs beaucoup plus antigénique que la souche capsulée dont elle dérive (4).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Des recherches antérieures sur les *Klebsiella* capsulées avaient montré ce, quel que soit le mode d'extraction des polysaccharides, on obtient à partir s corps microbiens aussi bien qu'à partir des milieux de culture dans les- els ils ont été sécrétés, des *polysaccharides identiques du point de vue immuno- ique*. Cette identité semble être indépendante du contenu des polysaccharides lipides, azote et oses.

L'étude faite à l'aide du microscope électronique sur les formes mucoïdes s *Klebsiella* dans différents stades de l'extraction des antigènes nous a permis confirmer notre hypothèse suivant laquelle ces polysaccharides isolés en s grandes quantités (20 g %), identiques du point de vue immunologique, aient *d'origine somatique*.

Dans cette communication sont présentés les résultats des recherches con- rnant deux souches de *Klebsiella* mucoïdes capsulées et leurs mutantes non- psulées (apparues spontanément dans les cultures de collection). Ces résultats ennent également à l'appui de notre hypothèse, car les mutantes non-capsulées ntiennent (il est vrai en quantité plus réduite et différant par les oses conte- ues des polysaccharides), qui du point de vue immunologique sont identiques x polysaccharides obtenus à partir des souches d'origine, capsulées.

L'identité immunologique des différents polysaccharides a été mise en idence selon la méthode de HEIDELBERGER ; les anti-sérums des souches capsulées, ssi bien que les antisérums des mutantes, après avoir été totalement adsorbés ec l'un des différents polysaccharides, perdaient leur capacité de précipiter ec tous les autres polysaccharides.

Par difference des variantes non-mucoïdes, les souches mucoïdes des *lebsiella* sont caractérisées par la présence d'une grande quantité de polysac- harides très solubles.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARBER C., WISNER B. et CIUCĂ M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 150.
2. BARBER C., STAMATESCO S. et WISNER B. — J. Hyg. Epidemiol., Microbiol. a Immunol. Prague, 1958, **2**, 57.
3. BARBER C., STAMATESCO-EUSTATZIOU S., TULPAN, G. et PETROVICI A. — J. Hyg. Epidemiol., Microbiol. a Immunol. Prague, 1960, **4**, 379
4. CIUCĂ M., STAMATESCO-EUSTATZIOU S., BARBER C., VOINEA M. et TULPAN G. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 347.
5. STAMATESCO-EUSTATZIOU S. et BARBER C. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960 **19**, 367.
6. CAREY W. F. et BARON L. S. — Journ. of Immunol., 1959, **83**, 517.
7. KNOLL K. H. — Ztsch. f. Immunitätsforsch. und exp. Therapie, 1958, **116**, 2.
8. OUCHTERLONY O. — Acta Pathol. microbiol. Scand., 1953, **32**, 231.
9. READ B., KELLER R. et CABELLI V. — Journ. of Bact. 1957, **73**, 765.
10. RIBI E., KELSEY M. et PERRINE TH. — Journ. of Immunol. 1959, **82**, 75.
11. WESTPHALL CL. — Pharm. Acta Helv., 1958, **33**, 401.
12. WILEY B. et SHERP H. — Canadian Journ. of Microbiol., 1958, **4**, 505.
13. GOSLING W. R. — Zblt. Bakt. I Orig., 1935, **134**, 195.
14. ERIKSEN J. et HENRIKSEN S. D. — Acta Path. Microb. Scand., 1959, **45**, 380 et 387.

К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИИ КЛЕБСИЕЛ

III. — ХИМИЧЕСКОЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДВУХ ШТАММОВ, ОБЛАДАЮЩИХ КАПСУЛОЙ, И ИЗ БЕЗКАПСУЛЬНЫХ МУТАНТОВ ДАННЫХ ШТАММОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из капсулированных штаммов клебсиелл удается получить как из микробных тел, так и из питательной среды, в которой выращивались микробы, специфические полисахариды, идентичные с иммунологической точки зрения. Данные полисахариды, находящиеся в количестве, превышающем 20 г% не происходят, по мнению авторов, (подтвержденном электроно-микроскопическим наблюдением) из капсулы, содержащей 98% воды.

То что из безкапсульных мутантов, происходящих от исходных капсулированных штаммов, получаются полисахариды, хоя и в меньших количествах и различные по содержанию «03», но сохраняющие иммунологическую тождественность с полисахаридами, вытянутыми из капсулированных штаммов, служит дополнительным доказательством соматического происхождения специфических полисахаридов.

Самым наглядным доказательством иммунологической идентичности изучаемых полисахаридов, какое бы ни было их происхождение и способ экстракции, является то, что сыворотка против капсулированного штамма, полностью адсорбированная одним (каким-либо) из полученных полисахаридов, теряет способность преципитировать в присутствии какого либо другого из изучаемых полисахаридов.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER BIOLOGIE DER *KLEBSIELLA*

III. CHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER AUS ZWEI BEKAPSELTEN STÄMMEN UND DEREN NICHT BEKAPSELTEN MUTANTEN ISOLIERTEN POLYSACCHARIDE

ZUSAMMENFASSUNG

Unabhängig vom Stamm und vom angewendeten Extraktionsverfahren, erhält man, sowohl aus den Bakterienzellen eingekapselter *Klebsiella*-Stämme, als auch aus der Nährflüssigkeit, in der sie sich entwickelt haben, spezifische, immunologisch identische Polysaccharide. Nach der Ansicht der Verfasser, die auch durch Elektronenbilder bestätigt wird, stammen diese Polysaccharide, die Mengen von über 20 g% ausmachen, nicht aus der Kapsel, die 98% Wasser enthält.

Die Tatsache, dass aus den nicht bekapselten Mutanten der bekapselten Ursprungstämme Polysaccharide gewonnen werden (wenn auch in geringerer Menge und mit einem anderen Zuckergehalt), welche mit den aus bekapselten Stämmen extrahierten Polysacchariden identisch sind, stellt einen weiteren Beweis des somatischen Ursprungs der spezifischen Polysaccharide dar.

Der überzeugendste Beweis der immunologischen Identität der untersuchten Polysaccharide, unabhängig von ihrem Ursprung und der Art des Extraktionsverfahrens, liegt in der Tatsache, dass ein Kapsel-Antiserum, nach vollständiger Adsorption mit einem beliebigen der erhaltenen Polysaccharide, die Fähigkeit mit irgendeinem anderen der untersuchten Polysaccharide zu präzipitieren einbüsst.

CONTRIBUTIONS TO A STUDY OF THE BIOLOGY OF THE *KLEBSIELLA*

III. CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF THE POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM TWO CAPSULATED STRAINS AND FROM THEIR NON-CAPSULATED MUTANTS

SUMMARY

Regardless of the strain and the method of extraction applied, immunologically identical specific polysaccharides may be obtained from the bacterial cells of capsulated *Klebsiella* strains as well as from the culture media in which they have developed. In the opinion of the authors,

tese polysaccharides which may exceed amounts of 20 g per cent do not originate from the capsule which contains 98 per cent water. This point of view is confirmed by electron micrographs.

From the non-capsulated mutants of the capsulated original strains, polysaccharides may be obtained in smaller amounts and with different sugar contents, which are, however, identical from the immunological point of view with those extracted from the capsulated strains. This affords additional evidence for the somatic origins of the specific polysaccharides.

The most convincing proof of the immunological intensity of the investigated polysaccharides, regardless of their origin or mode of extraction, consists in the fact that after complete absorption of an antiserum against a capsulated strain with one of the polysaccharides obtained, the respective antiserum will lose its ability to precipitate with any one of the others.

CHARACTER OF PLAQUE FORMATION BY *POLIOVIRUSES* IN VARIOUS COMMON CELL CULTURE SYSTEMS

by

Dina Sergiesco, R. Klein and F. Horodniceanu.

(Poliomyelitis Department of the Dr. I. Cantacuzino Institute)

— Received for publication April 12, 1960 —

Owing to the method devised by Dulbecco in 1952 (9), the production of plaques in cell cultures (i.e. of limited areas of necrosis on a monolayer, in fact virus colonies) has become possible. Thus, a means to direct the study of animal virus — host cell systems along similar lines as those followed in investigations of the bacteriophage was made available.

The fundamental theoretical principle according to which the formation of a plaque is determined by a single infecting virus particle has two main practical consequences: *a)* a new, sensitive and reproducible method for direct virus titration has become available; *b)* a reliable method has been devised for the isolation of pure virus lines.

The technique of plaque production was perfected by the author himself (10, 12, 44) as well as by other investigators, Youngner (47), Hsiung and Melnick (22, 23, 24) in the first place. Technical progress was mainly connected with the study of poliovirus and of the other enteric viruses. Yet the method became essential for the investigation of other animal viruses in various cellular systems as well, such as influenza A virus (18, 20, 46), Newcastle disease virus (17, 21, 37, 46), herpes virus (31, 36, 46, 47), vaccinia virus (18, 36, 46, 47), West equine encephalitis virus (9, 11, 46), Rift Valley fever virus (41), measles virus (25, 27), vesicular stomatitis virus (3, 16), foot- and mouth disease virus (1), haemadsorption virus (6), bird lymphomatosis virus (34), and polyoma virus (13, 45).

This experimental model which is unique in the study of animal viruses, allowed of fundamental investigations to be carried out concerning the following subjects:

A (a). The relationship between infecting (plaque-forming) particles and those detectable by morphological means (39). (b) The quantitative study of the neutralization of some animal viruses (11, 35, 37). (c) The virus-host cell relationship in the process of virus adsorption and multiplication in various cell systems (14, 15, 18, 19, 22, 47). All investigations of this type are based upon the advantages offered by the plaque method as regards direct and accurate quantitative determinations.

B (a). The isolation of various enteric viruses from mixtures (24, 25). (b) The identification and classification of some enteric viruses according to the pattern of the plaques (26). (c) The segregation of virus mutants, in particular of attenuated poliovirus particles in the presence of neuropathogenic ones (8, 26, 30, 38, 44), which has opened the way for genetic investigations of great theoretical (12, 21), and especially practical importance. The obtention of some of the main attenuated poliovirus strains used in polioimmunization with live virus (2, 38) affords an outstanding example of the results of these investigations.

The present study is an attempt to work out a method of poliovirus titration based on plaque formation in various culture systems and common cell lines, in order to select the most adequate experimental model for future investigations in our laboratory. Some resulting observations connected with the comparative value of these cell systems are reported below.

MATERIAL AND METHODS

Virus. The *Mahoney*, *MEF*$_1$, and *Saukett* prototype strains of poliovirus, kindly supplied by Dr. J. Salk, were used after several passages in our laboratory on primary monkey kidney (MK) cultures. In the present experiments the tests were made with samples of the virus suspensions used for the preparation of the first batch of inactivated vaccine produced by the "Cantacuzino" Institute (29). The suspensions were filtered through EKS$_1$ filter pads and stored at +4°C.

Tissue cultures. 1) Primary monolayer cultures of trypsinized Rhesus monkey kidney cortex (prim. MK). 2) Secondary cultures of monkey kidney cells (sec. MK). 3) The Detroit 6 cell line (40). The strain was kindly supplied by Dr. A. Svedmyr from the Bacteriological State Laboratory in Stockholm, and adapted to horse serum in our laboratory. 4) The HeLa cell line adapted to horse serum, which was maintained in our laboratory during the past 4 years.

All cultures were made in parallelipipedic 250 ml. flasks of Jena glass, stoppered with rubber plugs, similar in shape to the drug flasks used by Melnick (22); the useful surface of our flasks is of about 60 cm.^{2}.

Culture methods and nutrient fluids

1. Prim. MK cultures: $3 - 3.5 \times 10^6$ cells per flask, cultured in a fluid containing 0.5% lactalbumin hydrolysate and 2% calf serum which was replaced by 199 TCM after 5—6 days. A complete monolayer was formed on the 5th - 6th day following inoculation. We wish to thank Dr. G. Gancevici and Dr. I. Stoian from the Tissue Culture Laboratory of the Poliomyelitis Department for kindly supplying prim. MK cultures.

2. In order to prepare sec. MK cultures, confluent prim. MK cultures in Roux flasks were treated with versene (25—50 ml.) of a 0.02% versene solution (in PBS per flask). Each flask was seeded with $2—3 \times 10^6$ cells in 40 ml. 199 TCM + 5% horse serum. The cultures are confluent at the end of 24—48 hours, when they are inoculated.

3. Detroit cultures: the flasks are seeded with 5×10^6 cells in 40 ml. 199 TCM + 15% horse serum. After 4—5 days the fluid is replaced, the proportion of horse serum being decreased to 10%. The cell monolayer becomes complete after another 1—2 days and may then be inoculated.

4. HeLa cultures: the flasks are seeded with 3.5×10^6 cells in 40 ml. 99 TCM + 20% horse serum. In some cases the fluid is replaced after 4—5 days by another one containing 10% horse serum; in other cases the cell monolayer has become complete during this period and may be directly inoculated.

The following antibiotics were used in all fluids: penicillin 200 U/ml., streptomycin 200 γ/ml. and mycostatin 50 U/ml.

Agar overlay. We have adopted the following formulas which are variants of those given by YOUNGNER (45), and HSIUNG and MELNICK (23).

For prim. and sec. MK.:

(a) The nutrient fluid contains per 100 ml.:

30 ml. 10x concentrated Hanks solution (without phenol red)
11 ml. 5% sol. of Difco yeast extract in Hanks solution or in bidistilled water
6 ml. 5% sol. of Difco crystallized bovine albumin in bidistilled water
8 ml. 5.5% sodium bicarbonate solution
Aq. bidest. ad 100 ml.
Antibiotics (penicillin, streptomycin, mycostatin in three times higher concentrations than indicated above).

All solutions mentioned under (a) are sterilized by filtration.

(b) A 1/10,000 neutral red solution, extemporaneously prepared from a 1/100 stock solution.

(c) Difco Noble Agar, 3% in bidistilled water.

Solutions (b) and (c) are sterilized by autoclaving for 20 minutes at 120°C.

The three solutions are combined in equal parts, as follows: solutions (a) and (b) are mixed and maintained at 37°C, while the melted agar is cooled to 42—43°C and added to the mixture at the moment when the culture is overlaid.

For Detroit and HeLa cells.

(a) The nutrient fluid contains per 100 ml.:

30 ml. horse serum
27 ml. 10x concentrated Hanks solution
11 ml. 5% yeast extract solution
8 ml. 5.5% bicarbonate solution
Aq. bidest. ad 100 ml.
Antibiotics

Solutions (b) and (c) are the same as described above and the mixture is prepared in the same way.

Inoculation. The confluent cultures are once washed with 10 ml. Hanks solution (without phenol red) and then inoculated with various dilutions in Hanks solution (10^{-5} — 10^{-8}) of the investigated virus.

Each dilution is inoculated in 2—4 flasks, the inoculum amounting to 1 ml. virus dilution per flask.

The inoculated cultures are incubated for one hour at 37°C to allow virus adsorption, following which the cultures are three times washed with Hanks solution and covered with 18 ml agar medium per flask, the latter amount being calculated in relation to the surface of the culture. The flasks are covered with dark coloured cloth and left in the same position for 10—15 minutes during which the agar becomes solid. They are subsequently incubated at 37°C.

The plaques were daily examined and counted. In the last experiments, the centres were marked by dots on the flask in order to facilitate counting (3) (see Fig. 1 d).

RESULTS

1. The perfectly circular shape of poliovirus plaques as described in the literature (10, 24, 47) was recorded in prim. and sec. MK cultures (Fig. 1 and 2) as well as on Detroit cell monolayers. (Fig. 3). On the other hand, the plaques formed in HeLa cultures in most cases displayed much less regular outlines, being rarely circular, often rosette-shaped or slightly oval. (Fig. 4). Also, while on Detroit cells the contrast between the decolorized plaque and the background of intact cells (stained intensely red, especially at the periphery of the plaque) is clear-cut, sometimes even more accentuated than on MK, this contrast is much less obvious with HeLa cells and reading is more difficult.

2. The moments of appearance of the plaques are likewise different. On prim. and sec. MK, and sometimes on Detroit cells as well, the first few plaques appear 48 hours after inoculation; more plaques may be recorded on the third day in all cell systems, and there is a definite increase of their number on the next day, followed by a slow increase up to the 6th day. On HeLa cells the appearance of the first plaques is obviously delayed: it rarely occurs on the 3rd day, more often on the 4th, sometimes even on the 6th.

The cultures maintained a perfect condition and the pattern of unconfluent plaques remained characteristic for at least 10, often 14—17 days.

3. The size of the plaques as observed by us (Table 1) tallies with the figures recorded in the literature for poliovirus on prim. MK. Their diameter increased from 3—12 mm. (*Mahoney* and MEF_1 virus) on the first 3—4 days, to 12—35 mm. during the following 2—3 days. On the 9th day, plaque diameters of 45 mm. were sometimes recorded. The apparently smaller size of *Saukett* virus plaques is due to a delay of about 24 hours in the appearance of most plaques, as compared to the other two types. Indeed, the average dimensions of *Saukett* virus plaques on the 4th day (4—10 mm.) correspond to those of the other two types

Table 1

Size of poliovirus plaques in different cell cultures (in mm.)

Tissue cultures / Virus / Day fol. inoc.	Mahoney		MEF_1		Saukett	
	3—4	5—7	3—4	5—7	3—4	5—7
Prim. MK.	3—12*	12—23	4—11	21—25	3—8	6—22
Sec. MK.	4— 8	7—14	5— 6	12—16	3—5	10—14
Detroit	4— 8	8—17	3— 7	4—12	1—5	2—10
HeLa	1— 3	2— 9		5— 6		3— 5

* The figures are the averages of the minimum and maximum diameters

n the 3rd day, while on the 9th day the average diameter of *Saukett* virus aques is of 27—37 mm,. i.e. about equivalent to that of the plaques of the her two types on the 8th day.

In Detroit cultures the size of *Mahoney* plaques is about the same as on c. MK. MEF_1 and *Saukett* plaques are smaller. The maximum size recorded as 33 mm. on the 14th day *(Mahoney* strain). The smallest plaques were observed occur in HeLa cultures, their size amounting to about 1/4—1/3 of that of laques formed on prim. MK.

4. The titres in pfu/ml. (plaque-forming units per ml.) as inferred from ne number of plaques formed by the suspensions tested in the 4 cell systems, re shown in Table 2.

Table 2

Titres in pfu/ml. of poliovirus batches in various cell systems (expressed as $n \times 10^6$)

Tissue culture	Titration period	Mahoney batches			MEF_1 batches		Saukett batches	
		6—7	16—17	4—18	12—13	14—15	8—9	10—11
rim. MK	b		5.20		1.50			1.37
	c	1.75		4.00		1.65	2.80	
ec. MK	a	5.50	2.25	4.00	5,90	6.50	0.75	5.00
	b		4.00		3.30			
	c	0.75	3.50	1.50		2.00	0.55	0.30
Detroit	a	4.50	13.70	6.00	10.25	4.40	2.50	1.75
HeLa	a		4.50		0.88		2.38	
	b	1.00		2.60		1.33		
	c					1.00		0.75

Period a — June, 1959 — July, 1959
b — September, 1959 — November, 1959
c — December, 1959 — February, 1960

Since the initial aim of these determinations was not a comparative study of the efficiency of plating on the above-mentioned cell lines, the inocula were not maintained in adequate conditions (frozen) but, as shown in the section "Material", in the conditions of vaccine preservation (+ 4°C). Therefore, the comparative data reported have but the relative value of observations under the present experimental circumstances.

It may be noticed that: (a). The figures recorded on prim. and sec. MK are similar (the moment at which the titration was carried out, i.e. the decrease in titre due to preservation at $+4^0$C, being duly taken into account). (b) The titres recorded on Detroit cells are of the same order of magnitude as those recorded on MK (with some plus or minus variation). (c) As a rule, the number of pfu as determined by titration in HeLa cultures is smaller than in all the other systems.

In order to be able to compare the titres obtained in sec. MK cultures and expressed in pfu with those expressed in terms of cytopathogenic doses$_{50}$, transformations must be performed according to the relation:

$$1 \text{ CPD}_{50} = 0.7 \text{ pfu (10, 17)}$$

It may be seen (Table 3) that, although of the same order of magnitude, pfu titres are slightly lower than those calculated in terms of CPD$_{50}$ (by 0.3 $\log_{10}$ on an average). These results will be commented upon in detail in the discussion.

Table 3

Comparative figures of titrations performed on sec. MK by plaque method and the CPD$_{50}$ method [1])

Virus	Batch	Neg. log. CPD$_{50}$/ 0.2ml. (3)	Equiv. CPD$_{50}$ — AIUC[2] n x 10^5 (4)	Log. equiv. CPD$_{50}$/ ml. —AIUC	Pfu/ml. n x 10^6	Log. pfu/ml
Mahoney	7	5.65	1.5	6.17	0.75	5.86
	16—17	6.26	5.7	6.75	3.5	6.54
	4—18	5.71	1.8	6.25	1.5	6.17
MEF$_1$	12—13	6.44	8.9	6.94	3.2	6.50
	14—15	6.00	3.5	6.54	2.0	6.30
Saukett	8	5.55	1.1	6.11	0.55	5.74
	10—11	5.44	0.9	5.94	0.3	5.48

[1] The tube and flask cultures used in these comparative determinations were prepared from the same batch of MK cells.

[2] AIUC—Absolute infecting units calculated.

The figures in column (3) are computed according to Reed and Muench, 10 culture tubes being used for each dilution.

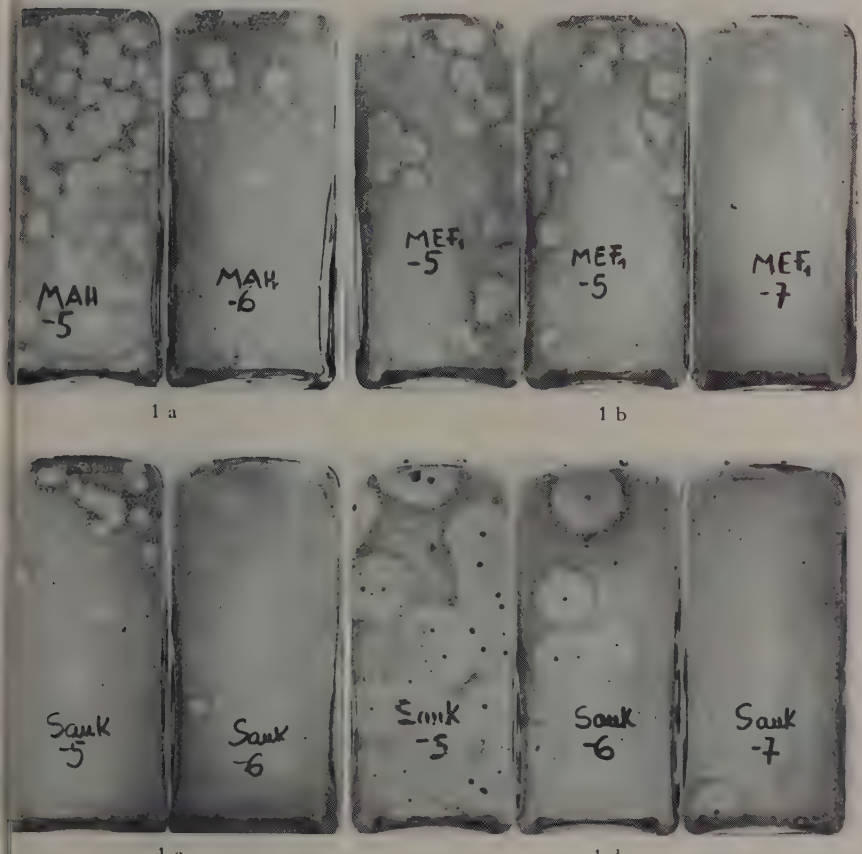
The figures in column (4) are computed by transforming the figures in column (3) into absolute values and multiplying by 3,5 (obtained from the CPD-pfu equivalence coefficient of 0,7 and the volume unit equivalence coefficient of 5).

DISCUSSION

1. A few remarks must be made concerning the method used for the production of plaques. We have adopted the method of closed flasks as devised by HSIUNG and MELNICK (23, 24) because no special incubators with CO_2 (7) are required in this case. This method afforded a long survival of the cells in good conditions (up to 17 days in some cases), which is very convenient, especially in the investigation of ECHO (25) or other unrelated viruses (13, 45).

However, it must be emphasized that the walls of the containers we were using were not perfectly plane (they displayed central proeminces — e.g. Fig. 3a). The useful surface of the flask was consequently diminished. These irregularities, varying from one flask to another, may partially account for the differences among and the low values of some of the titres recorded.

The culture fluids used yielded good results. The use of horse serum which ndispensable with tumoral cell lines may, of course, give rise to the objection t a lower efficiency of plating might have been due to the presence of an ibitor (43). This argument is not wholly invalidated by the obtention of high es on Detroit cells, since not all horse sera contain the inhibitor.



1 a 1 b

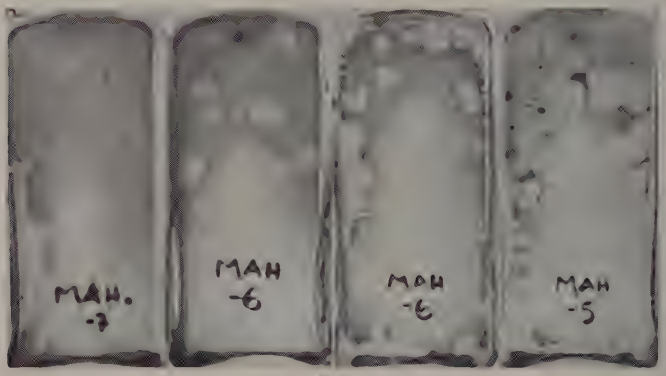
1 c 1 d

gure 1. Plaques on primary MK monolayers. 1a. Mahoney strain (batch 16—17) 4th y following inoculation; 1b. MEF_1 strain (batch 12—13), same; 1c. Saukett strain (batch 10—11), same; 1d. Saukett strain (batch 8), 6th day following inoculation.

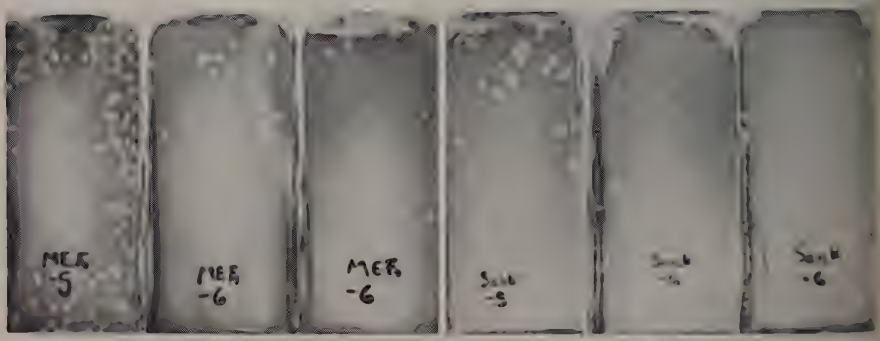
The presence of neutral red may likewise represent an inhibiting factor. n the one hand, under the influence of white light emitted by a fluorescence mp, neutral red is apt to cause degeneration of the cell layer (39), a circumstance nich may account for some unsuccessful experiments. This consideration ide us adopt shielding of the cultures by means of black cloth. On the other

2 a 2 b

Figure 2. Plaques on secondary kid cultures. 2a. Mahoney strain (batch 6—7), 5th day following inoculation; 2b. Saukett strain (batch 10—11), same.



3 a

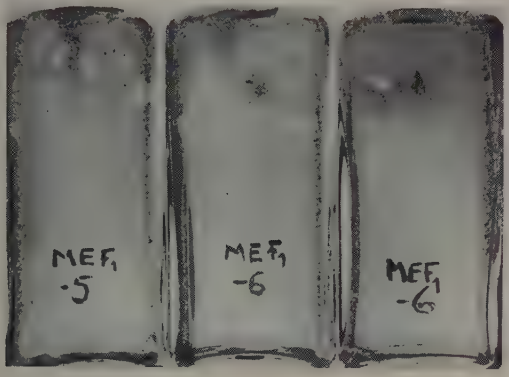


3 b 3 c

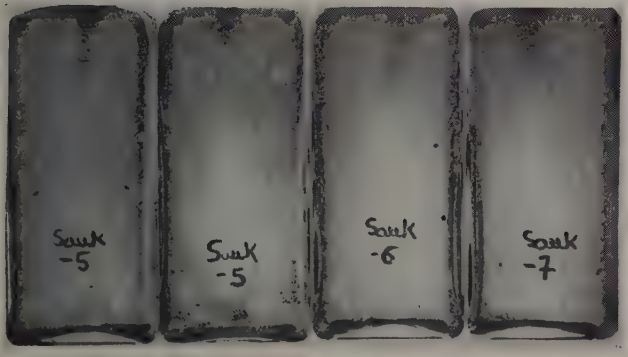
Figure 3. Plaques on Detroit monolayers. 3a. Mahoney strain (batch 4—18), 6th day following inoculation; 3b. MEF_1 strain (batch 12—13), 3d day following inoculation; 3c. Saukett strain (batch 10—11), 5th day following inoculation.

ed, there are some indications in the literature (4) concerning the direct action neutral red on infected cells. Consequently the method of adding neutral over a first agar layer no sooner than 3 days after inoculation of the flasks 6, 7, 13, 15, 16, 34, 36, 41, 42, 45) seems to be justified.

2. The titres obtained in prim. MK and sec. MK cultures may be seen to play no significant differences. The adoption of one or the other of these



4 a



4 b

ure 4. Plaques on HeLa monolayers. 4a. MEF_1 strain (batch 12—13), 8th day following inoculation; 4b. Saukett strain (batch 8—9). Same.
Note the irregular slope of the plaques.

tures as a system of assay will therefore depend on the possibilities of the oratory and on the degree of infection of the kidneys with simian viruses. troit cells afford a very useful system for the study of poliovirus, since they equally susceptible (similar titres and short period of incubation) and exhibit lear-cut contrast between plaques and normal cells. According to our experce HeLa cells are less adequate for the same purpose. Although the monolayer

forms rapidly and is very continuous and regular, the poor contrast, the delayed appearance, and the relatively small number of plaques, make us consider this system to be less favourable. There are many possible reasons for this behaviour: *a)* The presence of horse serum containing the inhibitor (43) may be discarded as a general explanation, since the same serum was often used for Detroit cultures, and since different batches of serum have been employed. Moreover, quotations in the literature exclusively refer to an inhibitor of type I poliovirus, while we have noticed titre differences with all types. (b) The generally lower and at any rate unequal susceptibility of HeLa cells, as compared to MK cells, was recorded by us in previous works as well (28). It may be connected with differences reported by some authors to exist even between clonal and parental HeLa cell lines (5), although MCLARREN and SYVERTON (36) have made statements to the contrary. However, we have repeatedly noticed variations to occur in the susceptibility of our HeLa cell line, as established by CPD_{50} determinations in tube titrations (unpublished experiments). We consequently feel inclined for the time being, to accept this general explanation.

3. After the performance of volume corrections *) and of the transformations required by the relation

$$1\ ID_{50} = 0.7\ \text{pfu (absolute infecting units)}$$

titres obtained in sec. MK tube cultures by the CPD_{50} method are seen to be slightly superior to those obtained by the plaque method.

According to the literature, the titres obtained by the two methods are either identical (10, 27) or up to 2—10 times higher (23) in the case of the plaque method.

In our case, the lower efficiency of plating may be accounted for by several factors: (a) The inhibiting action of neutral red as discussed above. (b) An apparent reduction of the number of plaques due to degeneration of cells situated on the proeminent area of some of the flasks used. (c) Since the figures obtained by transforming titres from CPD_{50} into absolute infecting doses are not directly obtained but computed, additional variations may be introduced by the two equivalence coefficients. (d) When the plaque method is applied, removal of the inoculum after one hour of adsorption and subsequent washing do not allow of more than about 50% of the total number of virus particles to become fixed (47), while with the CPD_{50} method the whole inoculum remains in the tube and therefore every trace of virus is supposed to be detected.

In experiments which are under way with the Brunenders strain on Detroit cells, simultaneous titrations yielded figures of $10^{6.5}$ ($= 1.65 \times 10^7$ infecting doses per ml.) and 4×10^7 pfu/ml. by the CPD_{50} and the plaque method respectively. The latter figure exceeds the former, in concordance with the data in the literature.

SUMMARY

1. The methods used for the production of poliovirus plaques in various cell cultures are described. The cell systems included primary and secondary monkey kidney cells, Detroit 6 cells, and HeLa cells.

*) CPD_{50} refers to a volume of 0.2 ml. Therefore CPD_{50} figures must be corrected by a coefficient of 3.5 (0.7×5) before being compared with pfu per ml.

2. The time of appearance, shapes, and sizes of the plaques in these culture ems are compared. The plaques were found to appear later, to be smallest ize, and more irregular in shape on HeLa cells.

3. The titres of the virus suspensions investigated, as expressed in pfu/ml., of the same order of magnitude on kidney and Detroit cells, while lower res are obtained on HeLa cells.

4. The efficiencies of the plaque and CPD_{50} methods of titration are com- d and the factors which may have interfered with the efficiency of plating discussed.

5. Owing to the great susceptibility of the Detroit 6 cell line, which is similar hat of monkey kidney cells, the use of the former is recommended for the duction of poliovirus plaques.

The authors wish to express their thanks to Mrs. Ileana Brucher for her nable technical assistance in the performance of this work.

REFERENCES

Bachrach H. L., Callis J. J., Hess W. R. and Patty R. E. — Virology, 1957, 4, 224.
Ciumakov M. P., Gagarina A. V., Laskevici V. A., Dzagurov S. G., Ralf N. M. Fleer G. P., Voroşilova M. K. and Robinzon I. A. — Vopr. Virusol. 1959, **5**, 533.
Cooper P. D. — Virology 1955, **1**, 397.
Darnell J. E. Jr., Lockart R. Z. Jr. and Sawyer T. K. — Virology, 1958, **6**, 567.
Darnell J. E. Jr. and Sawyer T. K. — Virology, 1959, **8**, 223.
Deibel R. — Virology, 1959, **8**, 262.
Dubes G. R. — Virology, 1956, **2**, 284.
Dubes G. R. and Wenner H. A. — Virology, 1957, **4**, 275.
Dulbecco R. — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1952, **38**, 347.
Dulbecco R. and Vogt M. — J. Exp. Med., 1954, **99**, 167.
Dulbecco R. Vogt M., and Strikland A.G.R. — Virology 1956, **2**, 162.
Dulbecco R. and Vogt M. — Virology 1958, **5**, 220.
Dulbecco R. and Freeman G. — Virology, 1959, **8**, 396.
Fogh J. — Virology, 1955, **1**, 324.
Fogh J. and Lund R. O. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1955, **90**, 80.
Franklin R. M. — Virology, 1958, **5**, 408.
Franklin R. M., Rubin H. and Davis C. A. — Virology, 1957, **3**, 96.
Furness G. and Youngner J. S. — Virology 1959, **9**, 386.
Ginsburg N. N. and Kasîmov K. T. Vopr. Virusol., 1959, 4, 742.
Granoff A. — Virology, 1955, **1**, 252.
Granoff A. — Virology, 1959, **9**, 636.
Howes D. W. and Melnick J. L. — Virology, 1957, **4**, 97.
Hsiung G. D. and Melnick J. L. — Virology, 1955, **1**, 533.
Hsiung G. D. and Melnick J. L. — J. Immunol., 1957, **78**, 128.
Hsiung G. D. and Melnick J. L. — Ann. N-Y. Acad. Sci., 1958, **70**, 342.
Hsiung G. D. and Melnick J. L. — J. Immunol., 1958, **80**, 282.
Hsiung G. D., Mannini A. and Melnick J. L. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, **98**, 68.
Ionesco-Mihăieşti C., Wisner B., Sergiesco D., Zamfiresco M., Klein R. and Horodniceanu F. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1959, **18**, 161.
Ionesco-Mihăieşti C., Ciucă Al., Mesrobeanu I., Wisner B., Horodniceanu F., Sergiesco D., Klein R., Zamfiresco M., Gancevici G., Arion R., Stoian I., Fenyves A. and Gaico N. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 321
Kanda Y. and Melnick J. L. — J. Exp. Med., 1959, **109**, 9.
Kaplan A. S. — Virology, 1957, 4, 435.
Klein S. W. and Goodgall S. H. — Science, 1959, **130**, 629.

33. Ledinko N. — Virology 1958, **6**, 512.
34. Levin S. and Sharpless G. R. — Virology, 1959, **8**, 265.
35. Mandel D. — Virology, 1958, **6**, 424.
36. Mc.Larren L. C. and Syverton J. T. — J. Immunol., 1957, **79**, 484.
37. Rubin H. and Franklin R. M. — Virology, 1957, **3**, 84.
38. Sabin A. B. — Spec. Publ. N-Y, Acad. Sci., 1957, **5**, 113.
39. Schwerdt C. J. and Fogh J. — Virology, 1957, 4, 41.
40. Stulberg C. S., Berman L. and Page R. H. — Virology, 1956, **2**, 844.
41. Takemori N., Nakano M. and Hemmi M. — Virology, 1955, **1**, 250.
42. Takemori N., Nomura S., Nakano M., Morioka Y., Hemmi M. and Kitaoka M. — Virology, 1958, **5**, 30.
43. Takemoto K. K. and Habel K. — Virology, 1959, **9**, 228.
44. Vogt M., Dulbecco R. and Wenner H. A. — Virology, 1957, **4**, 141.
45. Winocour E. and Sachs L. — Virology, 1959, **8**, 397.
46. Wright B. S. and Sagik B. P. — Virology, 1958, **5**, 573.
47. Youngner J. S. — J. Immunol., 1956, **76**, 288.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗОВАНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ПЯТЕН ВИРУСА ПОЛИОМИЭЛИТА НА НЕСКОЛЬКИХ ОБЩЕПРИНЯТЫХ СИСТЕМАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Описывают методику, применяемую для получения стерильных пятен вируса полиомиэлита на разных клеточных культурах: почечные клетки обезъяны (первичные и вторичные) клетки Детройт 6 и ГеЛа.

2. Изучали сравнительно моменты появления, форму и размеры стерильных пятен на данных системах культур; установлено что на клетках ГеЛа стерильные пятна появляются поэже, имеют самые малые размеры и наиболее нерегулярную форму.

3. Титры исследуемых вирусных суспензий, выраженные в Е О С П/мл, имеют одинаковую величину на почечных клетках и на клетках Детройт и меньшую величину на клетках ГеЛа.

4. Сравнивают эффективность метода титрования вируса при помощи стерильных пятен с методом цитопатогенной дозы и обсуждаются факторы, способные влиять на эффективность метода стерильных пятен в описанных технических условиях.

5. Рекомендуют применение клеточной линии Детройт 6 для получения стерильных пятен вируса полиомиэлита, имея в виду чувствительность данной линии к вирусу, такуюже как и чувствительность почечных клеток обезъяны.

CARACTÉRISTIQUES DE LA FORMATION DES PLAGES DE *VIRUS POLIO* SUR QUELQUES SYSTÈMES USUELS DE CULTURES CELLULAIRES

RÉSUMÉ

1. On décrit les méthodes employées afin d'obtenir les plages de virus polio sur différentes cultures cellulaires: cellules rénales de singes (primaire et secondaire), cellules Detroit et HeLa.

2. On compare le moment de l'apparition, la forme et la dimension des plages, constatant que sur les cellules HeLa les plages apparues sont plus tardives et les plus petites et irrégulières comme forme.

3. Les titres des suspensions virales étudiées, exprimés en unités *UFP*/ml, sont du même ordre de grandeur sur les cellules rénales et Detroit, mais ont une valeur plus réduite sur les cellules HeLa.

4. On compare l'efficience de la méthode de titrage à l'aide des plages à la méthode de la dose cytopathogène $_{50}$ et on discute les facteurs qui auraient pu influencer l'efficacité de la méthode des plages dans les conditions techniques décrites.

5. On recommande l'emploi de la lignée cellulaire Detroit 6 pour l'obtention des plages de virus polio, étant donné la susceptibilité de cette culture vis-à-vis du virus polio, similaire à celle des cellules rénales de singe.

CHARAKTERISTISCHEN MERKMALE DER PLAQUE-BILDUNG DURCH *POLIOVIRUS* IN EINIGEN GELÄUFIGEN ZELLKULTURSYSTEMEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es werden die Methoden beschrieben, die angewendet wurden um in verschiedenen kulturen Plaque-Bildung unter der Einwirkung von Poliovirus hervorzurufen. Verwendet rden (primare und sekundäre) Affennierenzellen, Detroit — 6 — Zellen und HeLa-Zellen.

2. Der Augenblick des Auftretens, die Form und die Ausmasse der Plaques in diesen ulturen wurden verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Plaques in HeLa Zell-ulturen später auftreten und kleiner und unregelmässiger sind.

3. Die Titer der untersuchten Virusaufschwemmungen (in *U.F.P.* — Einheiten pro Milliter ausgedrückt) sind in Detroit-Zellkulturen und in Nierenzellkulturen von der gleichen rdnungsordnung, jedoch niedriger in HeLa Zellkulturen.

4. Die Leistungsfähigkeit der Auswertungsmethode auf Grund der Plaque-Bildung rde mit derjenigen der Bestimmung der zytopathogenen Dosis $_{50}$ verglichen und die Faktoren ertert, die unter den beschriebenen technischen Bedingungen auf die Leistungsfähigkeit der Plaque-Methode eingewirkt haben könnten.

5. Für die Erzeugung von Poliovirusplaques wird die Verwendung von Detroit-6-Zellen mpfohlen, da dieser Zellstamm die gleiche Empfindlichkeit wie Affennierenzellen gegen-über Poliovirus aufweist.

L'ÉTUDE DE L'EMBRYOGÉNÈSE DES OEUFS *D'ASCARIS LUMBRICOIDES* DANS DES CONDITIONS VARIÉES D'OXYGÉNATION DU MILIEU

par

Angela Soresco, D. Panaitesco, C. Ciurea et Larissa Ianco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section d'Helminthologie sous la direction du Prof. Dr. Gh. Lupaşco)

— Manuscrit reçu le 20 mai 1960 —

L'épidémiologie de l'ascaridiose indique que la transmission de cette maladie parasitaire n'est possible que dans des conditions favorables au développement embryonnaire des oeufs de ce némathode, éliminés par le porteur dans le milieu environnant.

En étudiant ces conditions, divers auteurs ont précisé dans de nombreux travaux de la littérature de spécialité des dernières années, le rôle décisif joué par la température, l'humidité et le degré d'oxygénation du milieu pour le développement des oeufs d'*Ascaris;* la totalité de ces éléments représente une condition essentielle pour l'embryogénèse.

Concernant les deux premiers facteurs nécessaires au développement embryonnaire des oeufs d'*Ascaris*, la majorité des chercheurs sont d'accord que leur développement est conditionné par un certain degré de *température* (moyenne 2° à 22°) et d'*humidité* (moyenne 50% à 60%), mais leurs avis diffèrent sur le troisième élément « *le degré d'oxygénation du milieu* ».

On admet en général que les oeufs d'*Ascaris* absorbent de l'oxygène pendant leur développement embryonnaire, qui s'arrête dès que l'oxygène fait défaut (Zavadonski 1927). En 1928, Brown précise que l'oeuf d'*Ascaris suum* absorbe 0,0000025 mg d'oxygène pendant son développement; néanmoins les oeufs continuent à être viables en dépit du manque d'oxygène.

Hefter, cité par Vasilkova en 1949, prouve que dans l'eau des rivières les oeufs peuvent se développer à une température de 12° à 26° en présence d'une concentration en oxygène de 8 à 11 mg par litre d'eau et Usaciova (1951) indique que le développement des oeufs d'*Ascaris* dans l'eau des rivières n'est possible que lorsque la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau varie de 7 à 9 mg par litre d'eau et que le développement s'arrête dès que la quantité d'oxygène diminue au dessous des chiffres mentionnés.

En opposition de ces recherches, Gothie (1942) cité par Pick (1948) constate que l'évolution des oeufs d'*Ascaris megalocephale* serait possible même dans des conditions d'anaérobiose.

Par conséquent, il résulte que le problème du degré d'oxygénation du milieu, considéré comme élément spécifique nécessaire au développement embryonnaire des oeufs d'*Ascaris*, n'a pas été complètement élucidé jusqu'à présent.

En dehors de ces éléments, dans la littérature de spécialité une série d'auteurs indiquent l'existence de certains facteurs complémentaires, qui en agissant sur les oeufs d'*Ascaris*, peuvent stimuler l'embryogénèse par leur présence. JETMAR et EYNER (1951) et ensuite MÎRZA, UNGUREANU et collaborateurs (1953) ont prouvé que le formol, le froid et l'obscurité constituent dans l'ensemble un « *stimulus biochimique* » qui accélère l'embryogénèse des oeufs.

★

En considérant les données de la littérature de spécialité, nous nous sommes proposés de suivre si l'embryogénèse des oeufs d'*Ascaris lumbricoides* qui ont subi l'influence du « *stimulus biochimique* » (réalisé par le formol et par le froid), et non-influencés par ce stimulus, est possible dans des milieux aérobies et anaérobies, tout en vérifiant le pouvoir infestant des oeufs développés dans ces conditions sur les animaux de laboratoire.

Nous avons utilisé dans nos expériences des oeufs d'*Ascaris lumbricoides* récoltés dans des conditions d'asepsie parfaite, prélevés sur une portion de 5 cm de la bifurcation de l'utérus d'un *Ascaris* vivant. On a lavé ces oeufs au sérum physiologique stérilisé et on les a contrôlés au microscope avant de les ensemencer afin d'avoir la certitude de leur maturation.

Nous avons soumis une partie des oeufs d'*Ascaris* ainsi obtenus à l'influence du « *stimulus biochimique* » réalisé en immergeant ces oeufs pendant 5 jours dans la solution Ringer contenant de la formaline 5%, à la température de +4°. L'autre moitié a constitué le lot non-influencé par ce stimulus; ces oeufs ont été maintenus dans de la solution Ringer à la température de 20° pendant 5 jours.

Avec ces oeufs nous avons effectué deux séries de recherches:

Dans une première série de recherches nous avons ensemencé les oeufs ainsi traités sur des milieux aérobies et anaérobies et on les a maintenus à la température de 20°, afin de contrôler la possibilité de leur évolution. Les milieux de culture utilisés pendant ces expériences ont été:

a) *Milieux aérobies :* solution Ringer et eau distillée.

b) *Milieux anaérobies :* solution Ringer, eau distillée bouillie, refroidie et recouverte de paraffine, ainsi que de la paraffine bouillie et refroidie.

On a ensemencé les oeufs sur les milieux anaérobies en évitant l'introduction de la moindre quantité d'oxygène. La détermination qualitative, effectuée par colorimétrie a démontré que les milieux anaérobies utilisés avaient un degré d'oxygénation approximatif de 1 à 2 mg O_2 par litre de liquide.

On a suivi l'évolution des oeufs ensemencés, en prélevant périodiquement un nombre réduit d'oeufs des cultures, qu'on a ensuite examinés au microscope, en précisant ainsi les phases de leur développement:

1) la phase de blastomère
2) la phase de morule
3) la phase de planule
4) la phase de l'oeuf contenant la larve vivante.

Nous ne nous sommes pas limités à constater seulement la présence des
les larvaires dans nos cultures, mais avons essayé d'apprécier en même temps
ouvoir infestant des oeufs cultivés dans ces conditions. Nous avons effectué
contrôle du pouvoir infestant des oeufs des cultures en réalisant le cycle
monaire chez des cobayes d'un poids sensiblement égal, après avoir adminis-
par voie orale, une quantité d'environ 2000 oeufs contenant des larves vivantes
s oeufs maintenus 40 jours après leur développement complet en vue de la
uration).

Nous avons ainsi établi (d'après l'échelle de BROWN légèrement modifiée),
egrés de virulence des cultures, en rapport avec le degré de réactivité pulmo-
e.

Les résultats ainsi obtenus, concrétisés dans le tableau I, indiquent:

1. Les oeufs influencés par le stimulus biochimique se développent bien
s rapidement que ceux non influencés par ce stimulus.

2. Le temps du développement est variable, suivant le degré d'aérobiose
d'anaérobiose du milieu, mais l'évolution complète est réalisée même dans
conditions d'anaérobiose.

Il est certain que le pourcentage des oeufs qui se développent complète-
nt dans les milieux anaérobies est bien plus élevé pour les oeufs soumis à
citant biochimique ; néanmoins nous avons remarqué que les oeufs non-excités,
cés dans des milieux anaérobies (paraffine bouillie,eau bouillie), peuvent subir
évolution complète. (Exp. No. 12—13 Tableau I).

En continuant nos expériences, nous avons essayé de vérifier le pouvoir
estant de ces cultures sur l'animal et nous avons constaté que la période de
veloppement des oeufs d'*Ascaris* étant déterminée par l'excitant biochimique
par le degré d'aérobiose ou d'anaérobiose du milieu, leur pouvoir infestant
st point modifié par la méthode utilisée pour l'embryogénèse.

Après avoir démontré que les oeufs d'*Ascaris* peuvent se développer dans
conditions d'anaérobiose tout en gardant leur pouvoir infestant, dans la
conde partie de nos expériences nous avons essayé de préciser la limite
xygénation du milieu où l'embryogénèse des oeufs d'*Ascaris* serait possible.
us avons effectué *une seconde série de recherches dans les mêmes conditions que
premières*, en utilisant la solution Ringer et l'eau distillée, dans lesquelles
s avons déterminé la concentration de l'oxygène par litre de liquide.

L'expérience a été poursuivie ainsi qu'il suit:

On a introduit les oeufs d'*Ascaris* en tubes Thunberg chacun contenant
nl de solution Ringer ou de l'eau distillée.

On a équilibré le liquide contenu dans ces tubes par des mélanges de gaz
a pression atmosphérique, la pression partielle de l'oxygène étant de 1/2,
5, 1/10 et 1/100-ème de la pression partielle de l'oxygène de l'atmosphère.
conséquence la quantité d'oxygène dissoute dans le liquide à la température
20°C, exprimée en mg O_2 par litre, a été de 4,0 mg °/₀₀, dé 1,7 °/₀₀mg,
0,9 mg °/₀₀ et de 0,09 mg °/₀₀.

En partant des faits établis dans les travaux précédents, vu que l'évolution
s oeufs d'*Ascaris* est bien plus accélérée par l'application du stimulus bio-
mique, dans la seconde série de nos recherches nous n'avons employé que
s oeufs influencés par ce stimulus.

Les résultats ainsi obtenus, concrétisés dans le tableau II ont démontré:

Tableau No. 1

No. de l'expér.			Milieu de culture	CONTRÔLE le 12e jour	le 20e jour	le 29e jour	le 35e jour	le 45e jour	Le degré de réactivité pulmonaire chez l'animal infesté expérimentalement
1	Oeufs excités par le formol et le froid	Milieu anaérobie	Ringer bouilli	2% Pl	36% Pl	7% *L.v.*	10% *L.v.*		
2			Ringer bouilli avec de la paraffine	1% *L.v.*	30% *L.v.*	30% *L.v.*	30% *L.v.*		
3			Paraffine bouillie	13% *L.v.*	26% *L.v.*	36% *L.v.*	57% *L.v.*		
4			Eau bouillie	93% *L.v.*	56% *L.v.*	98% *L.v.*	98% *L.v.*		
5			Eau bouillie avec de la paraffine	31% *L.v.*	80% *L.v.*	87% *L.v.*	98% *L.v.*		
6		Milieu aérobie	Ringer non bouilli	17% *L.v.*	22% *L.v.*	29% *L.v.*	40% *L.v.*		
7			Ringer non bouilli avec de la paraffine	11% *L.v.*	58% *L.v.*	75% *L.v.*	80% *L.v.*		
8			Eau non bouillie	32% *L.v.*	46% *L.v.*	55% *L.v.*	98% *L.v.*		
9			Eau non bouillie avec de la paraffine	28% *L.v.*	30% *L.v.*	80% *L.v.*	98% *L.v.*		
10	Oeufs non-excités par le formol et le froid	Milieu anaérobie	Ringer bouilli	N	N	N	N	N	
11			Ringer bouilli avec de la paraffine	N	N	N	2% Bl.	15% Bl.	
12			Paraffine bouillie	6% Bl.	12% Pl.	6% *L.v.*	15% *L.v.*	25% *L.v.*	
13			Eau bouillie	5% Bl.	15% Bl.	30% Bl.	40% Pl.	32% *L.v.*	
14			Eau bouillie avec de la paraffine	3% Bl.	5% Bl.	10% Bl.	16% Pl.	30% Pl.	
15		Milieu aérobie	Ringer non bouilli	12% Bl.	18% Pl.	2% *L.v.*	18% *L.v.*	18% *L.v.*	
16			Ringer non bouilli avec de la paraffine	10% Bl.	8% Pl.	10% *L.v.*	3% *L.v.*	5% *L.v.*	
17			Eau non bouillie	11% Bl.	18% Pl.	31% *L.v.*	42% *L.v.*	50% *L.v.*	
18			Eau non bouillie avec de la paraffine	12% Bl.	20% Bl.	20% Bl.	30% Bl.	20% Bl.	

Légende; N = Oeufs non-évolués; Bl = Blastule; Pl = Planule; L.v. = Larve vivante

— La période d'évolution de ces oeufs (généralement rapide), est retardée rapport avec la diminution du degré d'oxygénation du milieu; toutefois bryogénèse est possible et, 6 mois après l'ensemencement, l'évolution com- de des oeufs soumis à l'influence des milieux contenant 0,09 mg O_2 par de liquide est accomplie.

— Au cours de la deuxième série d'expériences, les oeufs de contrôle extraits cultures (dans différents stades de leur évolution) et maintenus cette fois-ci même température que les premiers, mais dans des conditions d'oxygénation ituelles, reprennent le rythme normal d'évolution et atteignent le stade de e vivante dans un intervalle de temps très court.

Tableau II

La quantité d'O_2 du milieu	La date de l'ensemencement le 26.I 1957	CONTRÔLE						
		6. II (le 9e jour)	18.II (le 21e jour)	28.II (le 31e jour)	18.III (le 49e jour)	23.IV (le 85e jour)	27.V (le 119e jour)	27.VI (le 150e jour)
O_2 0,08086 mg/1	26 Janvier 1957	R. 2 bl.	2 bl.	2 bl.	2—4 bl.	2—4 bl.	6—8 Bl.[4]) et M.	30% *L.v.*
		A. 2 bl.	2 bl.	2 bl.	4 bl.	4 bl.	M.	70% *L.v.*
O_2 0,8086 mg/1		R. 2 bl.	4—6 bl.	4—6 bl.	4—6 bl.	6—8 bl.[3])	70% M	60% *L.v.*
		A. 2 bl.	6—8 bl.	8 bl.	De rares M. et états prélarvaires	M. et états prélarvaires	50% *L.v.*	100% *L.v.*
O_2 1,617 mg/1		R. 4 bl.	4—6 bl.	4—6 bl.[2])	4—6 M.	60% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*
		A. 4 bl.	6—8 bl.	M.	60% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*
O_2 4,043 mg/1		R. M.[1])	60% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*
		A. M.	70% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*	100% *L.v.*

1) = Les œufs extraits du milieu anaérob e et maintenus dans une chambre humide à 20° dans des conditions ygénation normale atteignent le 9.IV — (le 12e jour après l'ensemencement ou le 3e jour après avoir été retirés milieu) — stade de l'œuf contenant la larve vivante, en proportion de 70%

2) = Les œufs extraits du milieu anaérobie et maintenus dans une chambre humide à 20° dans des conditions ygénation normale atteignent le 11.III — (le 42e jour après l'ensemencement ou le 11e jour après avoir été és du milieu) — stade de l'œuf contenant la larve vivante en proportion de 80%.

3) = Les œufs extraits du milieu anaérobie et maintenus dans une chambre humide à 20° dans des conditions ygénation normale atteignent le 5.V. — (le 100e jour après l'ensemencement ou le 15e jour après avoir été és du milieu) — stade de l'œuf contenant la larve vivante en proportion de 80%.

4) = Les œufs extraits du milieu anaérobie et maintenus dans une chambre humide à 20° dans des conditions d'oxygénation normale atteignent le 16.VI — (le 139e jour après l'ensemencement ou le 20e jour après avoir retirés du milieu) — stade de l'œuf contenant la larve vivante en proportion de 70%.

Légende = Bl = blastule; M = morule; Pl = planule; L.v. = larve vivante; O_2 = oxygène; R = Ringer; eau

— Enfin, le pouvoir infestant des oeufs est maintenu, les animaux infestés par une quantité égale d'oeufs réagissant tous de la même manière dans un intervalle de temps approximativement égal.

Nous précisons que les résultats obtenus en vue de connaître plus exactement l'épidémiologie de l'ascaridiose constituent la suite de certaines recherches publiées précédemment, où nous avons étudié l'influence des deux autres facteurs: la *température* et l'*humidité* dans le développement des oeufs d'*Ascaris*.

Par ces recherches qui seront complétées par des expériences sur le terrain — (recherches pas encore achevées) — nous avons essayé d'apporter une nouvelle contribution à l'étude de l'épidémiologie de l'ascaridiose, tout en prouvant la possibilité de retarder l'évolution des oeufs d'*Ascaris* dans des conditions d'anaérobiose.

Ces faits, ainsi que la possibilité de l'évolution des oeufs extraits du milieu anaérobie démontrent que les oeufs des sédiments des bassins de décantation, les oeufs des sédiments des eaux stagnantes et ceux de la fange des rivières considérés jusqu'à présent non-viables, peuvent constituer un élément infestant, analogue à celui des oeufs d'*Ascaris* évoluant sur le sol ou dans l'eau dans des conditions normales d'aérobiose.

En ce qui concerne le froid, jusqu'à +4°, nous sommes d'accord avec les faits présentés par les auteurs cités, JETMAR, MÎRZA, UNGUREANU et collaborateurs, qui indiquent que cet élément n'est point un facteur de retardement de l'évolution des oeufs d'*Ascaris*, mais bien au contraire qu'il accélère le développement embryonnaire des oeufs.

Finalement nous voulons préciser que pour apprécier la complète maturation des cultures d'oeufs d'*Ascaris*, le contrôle du pouvoir infestant sur animal constitue une méthode simple à la portée des chercheurs, qui devra être toujours utilisée dans des recherches de ce genre.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALF, S. L. — An. Rom. Sov. Seria Ig. şi Org. Sanit., 1953. No. 1, 16.
2. BROWN, W. H. — J. Parasit., 1928. **14**, 141.
3. BROWN, W. H. et CHAN, F. K. — Am. J. Veterinary Research, 1953. **16**, 613.
4. CLADWELL, F. C. et CLADWELL, E. L. — J. Parasit., 1928. **14**, 485.
5. JETMAR, H. M. et EXNER, H. — Arch. Hyg. Bakt., 1951. **134**, 73.
6. MÎRZA, D. D., UNGUREANU, E. et BOLDESCO, I. — Bul. St. Acad. R.P.R., Ser. Med., 1953. **5**, 421.
7. NITULESCO, V., SORESCO, A. et PANAITESCO, D. — Studii şi Cercet. de Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., 1956. No. 3—4, 553.
8. PICK, F. — Bull. Soc. Pathol. Exotique, 1948. **41**, 208.
9. PODIAPOLSKAIA, V. P. — Terapevticeski arhiv, 1950. **22**, 79.
10. ROMAN, N. — Influenţa migrării larvelor de Ascarizi asupra organismului animal în condiţii de alimentaţie completă şi avitaminoza A. Bucarest, 1956. Ed. Med.
11. S'ANDARS, D. F. — Nature, 1951. **177**, 730.
12. SKRIABIN, K. I. — Ghelmintozî celoveke Ceast I—II, 1931. Moscou, Medghiz.
13. USACEVA, A. M. — Ghighiena i Sanitaria, 1951. No. 12, 12.
14. VASILKOVA Z. G. et HEFTER, V. A. — An. Rom. Sov. Seria Ig. şi Org. Sanit., 1953. No. 1, 7.
15. VASILKOVA, Z. G. — An. Rom. Sov. Seria Ig. şi Org. Sanit., 1953. No. 1, 29.

6 Zavadovski, M. M. et Sidorov, K. M. — Trudî, laboratorii experim. biologhii. Moskovskovo Zooparka, 1927, **3**, 1959.
7 Zavadovski, M. M. — Trudî laboratorii experim. biologhii, Moskovskovo Zooparka, 1928, **4**, 168.

УЧЕНИЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЯИЦ *Ascaris lumbricoides* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КИСЛОРОДНОГО РЕЖИМА СРЕДЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В литературе по специальности указано, что эмбриогенез яиц *Ascaris lumbricoides* ет развиваться только в средах, содержащих 5,5—7 мг 0_2 на литр жидкости.

В первой серии опытов, работая параллельно с яйцами аскарид, развитие которых о ускорено при помощи «бисхимического стимула» и с яйцами, не бывшими под влия-м данного стимула авторы показали, что для обеих серий яиц развитие возможно при даже в условиях анаэробиоза.

Во второй серии опытов, работая только с яйцами аскарид, развитие которых было рено под влиянием «бисхимического стимула», авторы проследили развитие этих яиц 20° в растворе с количественно определенной концентрацией кислорода (4,0 мг 0_2/ литр),09 мг 0_2/ литр).

В этих условиях эмбриогенез развивается медленно. Процесс становится более продолжительным в прямой зависимости от снижения концентрации кислорода в среде. Контрольные яйца, переведенные из анаэробных сред в аэробные (при одинаковой температуре) возобновили нормальный темп развития.

Инвазивные свойства яиц, выращиваемых в подобных условиях не меняются в связи с степенью аэробиоза или анаэробиоза среды, в которой происходит эмбриогенез.

Вышеизложенная экспериментальная работа приносит вклад в эпидемиологическое учение аскаридиоза тем, что доказывает возможность развития яиц *Ascaris lumbricoides* (с сохранением их инвазивных свойств) в условиях анаэробиоза, могущих встречаться в окружающей среде.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EMBRYOGENESE DER EIER VON *ASCARIS LUMBRICOIDES* AUF NÄHRBODEN MIT VERSCHIEDENEM SAUERSTOFFGEHALT

ZUSAMMENFASSUNG

In der Fachliteratur wird angegeben, dass die Embryogenese der Eier von *Ascaris lumbricoides* nur in Nährböden stattfindet, deren Sauerstoffgehalt 5,5—7 mg/l Nährflüssigkeit beträgt.

In einer ersten Reihe von Versuchen haben die Verfasser gleichzeitig mit Eiern von *Ascaris lumbricoides*, deren Entwicklung durch einen « biochemischen Stimulus » beschleunigt wurde und mit Eiern, die nicht derartig behandelt worden waren gearbeitet. Es wurde festgestellt, dass in beiden Gruppen die Entwicklung der Eier selbst unter anaeroben Bedingungen möglich ist.

In einer zweiten Reihe von Untersuchungen wurden nur Eier von *Ascaris lumbricoides* verwendet, deren Entwicklung durch einen « biochemischen Stimulus » beschleunigt worden war. Die Verfasser verfolgten die Entwicklung bei einer Temperatur von 20°C, in Lösungen deren Sauerstoffgehalt quantitativ bestimmt worden war (4,0 mg O_2 pro 1 bis 0,09 mg O_2 pro 1).

Unter diesen Umständen verläuft die Embryogenese langsam. Ihre Dauer ist in direkter Abhängigkeit von der Herabsetzung der Sauerstoffkonzentration in der Nährflüssigkeit verlängert. Kontrolleier, die aus anaeroben Nährflüssigkeiten in aerobe übertragen wurden (gleiche Anbrühngstemperatur) nahmen ihren normalen Entwicklungsrhytmus wieder auf.

Die Infestationsfähigkeit der unter diesen Umständen gezüchteten Eier wird durch das Ausmass von Aerobiose oder Anaerobiose in der Nährflüssigkeit, in der die Embryogenese stattfindet, nicht beeinflusst.

Die vorliegende experimentelle Untersuchung bringt einen Beitrag zum epidemiologischen Studium der Askaridiose, insofern darin nachgewiesen wird, dass sich die Eier von *Ascaris lumbricoides* unter Beibehaltung ihrer Infestationsfähigkeit in den anaeroben Bedingungen, die in der äusseren Umwelt auftreten entwickeln können.

A STUDY OF THE EMBRYOGENESIS OF THE EGGS OF *ASCARIS LUMBRICOIDES* IN VARIOUS CONDITIONS OF OXYGENATION OF THE CULTURE MEDIUM

SUMMARY

The embryogenesis of eggs of *Ascaris lumbricoides* is reported in the speciality literature only to be possible in media containing 5.5 to 7 mg O_2 per liter of fluid.

In a first series of experiments the authors have comparatively investigated eggs of *Ascaris lumbricoides* whose development had been accelerated by means of a « biochemical stimulus » and eggs which had not been subjected to any influence of this kind. In both groups the development of the eggs was found to be possible, even in anaerobic conditions.

In another series of investigations in which only eggs of *Ascaris lumbricoides* were used whose development had been accelerated by means of a « biochemical stimulus », the authors followed up their development at a temperature of 20°C in solutions in which the amount of oxygen had been quantitatively determined (4.0 mg per liter, down to 0.09 mg per liter).

In these conditions embryogenesis is slow. Its duration increases in direct proportion to the decrease of oxygen concentration in the medium. Control eggs transferred from anaerobic media into aerobic media (same temperature during incubation) resumed their normal rate of development.

The infesting ability of the eggs hatched under these conditions is not altered by the degree of aerobiosis or anaerobiosis in the medium in which embryogenesis takes place.

The present experiments are a contribution to the epidemiological study of ascaridiosis, in as much as they prove the ability of eggs of *Ascaris lumbricoides* to develop in anaerobic conditions such as may possibly prevail in the environment, without losing their infesting properties.

AYON EFFECTIF DE DIFFUSION (R_{ES}) DE LA MOLÉCULE DE DEXTRAN ET SON IMPORTANCE

par

D. Stavri

(Travail de la Chaire de Microbiologie, sous la direction de M. Ciucă)

— Manuscrit reçu le 2 avril 1959 —

On sait que le passage de l'eau et des substances dissoutes à travers la roi capillaire paraît avoir lieu par un processus qui ne nécessite pas une transformation énergétique de la part de la cellule endothéliale capillaire. Par conséient, ce passage n'est pas un « transfert actif » (Pappenheimer, Renkin, Borrero, 951, (1)), la vitesse de mouvement d'un liquide à travers la paroi capillaire ant proportionnelle avec la différence entre les forces hydrostatiques et osmotiques qui actionnent sur la membrane capillaire.

La composition chimique des liquides d'ascite, d'oedème ou glomérulaire t presque identique à celle de la composition du liquide obtenu après filtrage u plasma à travers des membranes inertes, artificielles, d'une certaine porosité. a filtration à travers les capillaires périphériques, ainsi qu'à travers les membranes artificielles, varie de manière inversement proportionnelle à la viscosité u liquide, étant modifiée par la température.

Les ressemblances entre la perméabilité des capillaires et les membranes oreuses artificielles ont donné naissance à la dite « pore theory » des échanges apillaires.

On suppose, selon cette théorie des « pores », que la paroi capillaire est perorée par de nombreuses ouvertures ultramicroscopiques, avec un diamètre op étroit pour permettre le passage des molécules des protéines plasmatiques, ais suffisamment large pour le passage de l'eau, des électrolytes et des composés on-protéiques du plasma. On a démontré que la membrane glomérulaire permet passage de certaines molécules des dimensions de l'inuline, qui ont un rayon ffectif de diffusion (R_{ES}), calculé d'après la formule d'Einstein, de 14,8 Å, ou e celles de l'ovalbumine, qui ont un R_{ES} de 28 Å (Bayliss, Kerridge, Russel 933 (2), Richards, 1941 (3), Marshall, Deutsche, 1950 (4), etc.); le diamètre e ces pores a été calculé, par cette méthode, comme étant d'environ 100 Å. D'après les recherches de Wallenius, 1954 (9), les *diamètres* des pores rénaux arient, selon une courbe Gaussienne, leur moyenne étant de 48 Å, avec une léviation standard de 12 Å. Les molécules avec un *rayon effectif* de diffuion de 30 Å ne peuvent passer directement à travers le filtre rénal, leur éliination nécessitant une fragmentation métabolique préalable. Les molécules vec un rayon effectif de diffusion plus petit, non fixées par les tissus, peuvent acilement s'éliminer par le filtre rénal.

Vu qu'un des principaux problèmes soulevés par les substituents macromoléculaires de volume du plasma, réside dans le fait d'empêcher une élimination rapide par le filtre rénal, la détermination de la forme et de la dimension de la molécule d'une pareille substance a joué un rôle primordial. Les substituents de volume du plasma ayant des molécules avec un rayon effectif de diffusion plus petit que les pores du filtre rénal et endothélial, passent rapidement dans le torrent circulatoire, devenant inefficaces du point de vue thérapeutique. Les substituents de volume du plasma ayant des molécules plus grandes que le filtre rénal et tissulaire, sont thérapeutiquement efficaces, assurant le rétablissement de l'hémodynamique. Ces macromolécules présentent pourtant l'inconvénient de se maintenir *trop longtemps* dans la circulation sanguine, se déposant, si elles ne sont pas métabolisées et fragmentées par les systèmes enzymatiques de l'organisme, dans les organes et les viscères, où elles peuvent déterminer les phénomènes complexes du syndrome macromoléculaire (Hueper, 1942 (5)).

Par conséquent, il a été nécessaire de déterminer le rayon effectif de diffusion de la molécule de dextran d'us clinique, capable d'assurer, en même temps, un bon effet thérapeutique de substitution et une élimination relativement lente, mais totale, du torrent circulatoire, par le scindement des liaisons α — glucosidiques 1—6.

Les données de la littérature concernant le dextran sont relativement réduites. Ingelman et Halling 1949 (6) ont étudié le dextran éliminé par voie rénale chez les malades qui l'avaient reçu à fin thérapeutique. Le poids moléculaire (déterminé par ultra-centrifugation) de la plus grande fraction éliminée a été de 36.000.

Friberg, Graff, Aberg, 1951 (7) ont effectué des études similaires sur le lapin, établissant que la plus grande fraction moléculaire, éliminée par voie rénale, a un poids moléculaire de 40.000.

Ces données sont insuffisantes, vu que la structure de la molécule de dextran est différente de celle des autres polymères et qu'elle varie d'une souche à l'autre. Il est connu que la macromolécule de dextran a une structure fibrillaire, les molécules constituantes de glucose présentant des liaisons entre C_1 et C_6.

La forme et la dimension de la molécule de dextran en solution varie en fonction du poids moléculaire et du degré de ramification de la molécule. Les études concernant la viscosité et le poids moléculaire des solutions de dextran ont permis certaines constatations.

Selon les données connues, la viscosité intrinsèque (η_i) d'une molécule, dans une solution colloïdale de polymère, est en relation avec le poids moléculaire du solvith, d'après l'équation

$$\eta_i = KM^{\alpha} \qquad (1)$$

formulée par Mark (1938) (8), où K et α sont des constantes typiques pour le système solvith-solvent utilisé. La constante, pour une molécule fibrillaire (sans ramifications), est superunitaire.

Les recherches de WALLENIUS (1954 (9)) ont établi pour le système dextran-*) ... $K = 0,72 \times 10^3$ et $\alpha = 0,53$. Les recherches de HULBURT, HERMAN, ...OBOLSKY et EYRING (10), ont montré que les valeurs sous-unitaires α corres-...ndent à une molécule de polymère, qui, en solution, peut être décrit comme ... « collier de perles », où le solvent se meut librement parmi les perles (FLORY, ...44, (11)), constituant des « sphères hydrodynamiques », élastiques, à densité ...égale allant de la périphérie au centre de la sphère. Comme le dextran appa-...t probablement au niveau de filtres naturels sous cette forme de « sphères ...drodynamiques » élastiques, l'étude de ses effets physiologiques revêt, à ...té de celle du poids moléculaire, une importance particulière en ce qui con-...rne les dimensions de cette sphère hydrodynamique.

Ces considérations nous ont déterminé à calculer le rayon effectif de diffu-...n (R_{Es}) du dextran préparé par nous, avec la souche No. 4, isolée en Roumanie (...ŞANU et coll., 1956 (12)).

MATÉRIEL, MÉTHODE ET RÉSULTATS

On a utilisé deux séries de dextran, préparées par nous (série A et B) et ... dextran importé (série C). Les caractéristiques de ces séries, sont:

	Série A	*Série B*	*Série C*
...el	4,174	4,860	—
...nt	0,230	0,262	—
$_{25°C}cm^2/sec^{-1} \times 10^7$	$4,66 \pm 0,04$	$4,25 \pm 0,04$	$4,85 \pm 0,05$
...oids moléculaire moyen ...ar diffusion translationnelle) =	86×10^3	116×10^3	75×10^3

La constante de diffusion D a été calculée d'après la méthode de l'aire des ...rdonnées maxima, qui utilise le fait que $x = 0$, les ordonnées étant maximales ... égales

$$n'max = \frac{n_1 - n_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \qquad (2)$$

Résolvant pour D et subtituant pour $(n_1 - n_0)$ l'aire A, on obtient

$$D = \frac{A^2}{4\pi t (n'max)^2} \qquad (3)$$

L'aire A représente l'aire qui se trouve sous la courbe obtenue avec l'ap-...areil de diffusion, calculée par intégration graphique avec un planimètre.

L'appareil utilisé a été de type FOKAL B. Les images ont été photogra-...hiées et reproduites à une échelle connue (Fig. 1, 2, 3). Les ordonnées ...axima et les aires ont été mesurées avec une précision de $\leqslant 0,1\%$ pour les ...ngueurs et de $\leqslant 1\%$ pour les surfaces.

D'après les données de diffusion translationnelle on a également calculé ...es poids moléculaires.

*) Souche NRRL — B_{512}

Selon la formule donnée par EINSTEIN, 1907 (13), le rayon effectif de diffusion (R_{ES}) d'une telle molécule, peut être calculé d'après la formule:

Fig. 1. — Série de Dextran A, préparé de la souche de Leuconostoc mesenteroides No. 4

Fig. 2. — Série de Dextran B, préparé de la souche de Leuconostoc mesenteroides No. 4

Fig. 3. — Série de Dextran C, importé

$$R_{ES} = \frac{RT}{6\pi\eta\, DN} \qquad (4)$$

dans laquelle: R = constante des gaz
T = température absolue
η = viscosité de l'eau
D = constante de diffusion
N = nombre d'Avogadro

Les valeurs utilisées ont été les suivantes:

$R = 8{,}31 \times 10^{-7}$ Erg./grad. mol;
$T = 294^0$ K., $\eta = 0{,}981 \times 10^{-2}$ poisses
$N = 6{,}023 \times 10^{-23}$

D lot A = $4{,}66 \pm 0{,}04 \times 10^7$.cm²/sec.$^{-1}$
D lot B = $4.25 \pm 0{,}04 \times 10^7$.cm²/sec.$^{-1}$
D lot C = $4{,}85 \pm 0{,}05 \times 10^7$.cm²/sec.$^{-1}$

On a calculé les rayons de diffusion suivants:

R_{ES} Lot A = 47,1 Å
R_{ES} Lot B = 51.6 Å
R_{ES} Lot C = 45,2 Å

Le dextran présentant ces caractéristiques a été étudié, du point de vue la capacité anaphylactogène, sur le cobaye et, selon la technique de DALE-HULTZ, sur l'iléon terminal du cobaye. Ce produit s'est montré dépourvu ntigénicité pour les cobayes.

En même temps, on a étudié sur le chien la capacité de substitution du ume plasmatique. Le dextran, par les caractéristiques mentionnées, possède la pacité d'élever la tension artérielle des animaux en collapsus hémorragique et la maintenir pendant plusieurs heures. La hausse de la pression térielle chez les animaux en choc hémorragique, réinfusés avec du xtran, est accompagnée de la réapparition du réflexe presseur carotidien . EŞANU et coll., 1957 (14)).

DISCUSSION

On a réussi à déterminer le rayon effectif de diffusion sur 3 lots de dex-n, en déterminant la constante de diffusion D du dextran préparé par nous ec la souche No. 4 de *Leuconostoc mesenteroides*. Considérant que les sub-nces avec un rayon effectif de diffusion plus grand que 30 Å, donc avec diamètre de 60 Å, ne peuvent traverser le filtre rénal sans fragmentation éalable, nous comprenons l'effet favorable des solutions préparées par nous ec la souche No. 4 (voir note antérieure (14)). Cet effet justifie expérimentale-ent l'observation selon laquelle les dimensions moléculaires des fractions s plus actives, du point de vue clinique, sont celles qui ont un poids molé-ulaire de 70.000 $\pm$ 20.000. L'utilisation de fractions de dextran avec un poids oléculaire plus grand et avec un rayon effectif dépassant 30 Å, bien qu'assu-nt une persistance prolongée du substituent dans le torrent circulatoire, ne raît pas indiquée vu la nécessité d'un plus grand nombre de fragmentations e la molécule.

Généralement, l'organisme humain possède la capacité d'hydrolyser len-ment les liaisons α-glucosidiques 1—6; dans le cas où le processus dure op longtemps, la macromolécule de dextran peut agir soit comme anti-ène, déterminant une sensibilisation anaphylactique, soit comme produit non-étabolisable avec tendance à se déposer dans les viscères, en déterminant les anifestations complexes du syndrome macromoléculaire (HUEPER, 1942 (5)).

Les récentes recherches de KABAT et BEZER (1958 (15)), ont montré l'im-ortance de la dimension moléculaire du dextran, pouvant déterminer chez homme une sensibilisation anaphylactique. Les auteurs montrent que les ndividus injectés avec un dextran, ayant un poids moléculaire de 90.700—94.000, donc avec un R_{ES} probablement plus grand que 80 Å, présentent une ausse appréciable du titre des anticorps précipitants anti-dextran, tandis que es personnes inoculées avec un dextran préparé avec la même souche de *euconostoc mesenteroides*, mais avec un poids moléculaire et un R_{ES} plus petits, 'ont pas présenté une augmentation du titre.

De ces données il résulte clairement que le dextran avec un poids molé-ulaire de 50—90.000 et un R_{ES} supérieur au diamètre des « pores rénaux » peut e maintenir dans le torrent circulatoire un temps utile, étant toutefois suffi-amment fragmenté en de toutes petites molécules et éliminé avant de déter-niner l'apparition des anticorps spécifiques. Ces données ne sont valables que

pour les molécules de dextran fibrillaire avec un pourcentage maximum de liaisons α-glucosidiques 1—6 (96—100%). La présence des liaisons latérales de ramification de type $C_1—C_4$ ou $C_1—C_3$—confère à la molécule de dextran — du même poids moléculaire — un rayon effectif de diffusion (R_{Es}) plus grand, qui passe, par conséquent, plus difficilement par le filtre rénal. Ces données confirment d'ailleurs les observations d'autres auteurs démontrant que plus la structure moléculaire du dextran est fibrillaire, plus les réactions allergiques sont faibles (MAURER, 1957 (16)). Cette observation a mené à l'emploi de la souche américaine de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B_{512}, avec 96—98% liaisons 1—6, sur une grande échelle.

Les données présentées attirent en premier lieu l'attention sur l'importance du rayon effectif de diffusion de la molécule de dextran, afin de comprendre les modifications physio-pathologiques qui se produisent à la suite de l'administration (dans la clinique) de cette substance.

CONCLUSIONS

1. On présente, dans cette note, la détermination du rayon effectif de diffusion de la molécule de dextran, préparé avec la souche No. 4 de *Leuconostoc mesenteroides*, isolée par les auteurs.

2. Le calcul de la constante de diffusion ($D_{25°C}cm^2/sec.^{-1} \times 10^7$) a été effectué à l'aide de l'appareil de diffusion Tiselius type FOKAL-B: donnant pour le lot A = 4,66 ± 0,04; lot B = 4,25 ± 0,04; lot C = 4,85 ± 0,05.

3. La constante de diffusion déterminée a permis le calcul du poids moléculaire de ces lots, d'après la relation $M = K\left[\frac{T}{D}\right]^3$, soit 86.000 pour le lot A, 116.000 pour B et 75.000 pour le lot C.

4. Le rayon effectif de diffusion de ces lots a été calculé selon la relation donnée par STOKE et EINSTEIN: $R_{Es} = \frac{RT}{6\pi\eta DN}$; les valeurs obtenues sont: lot A = 47,1 Å; lot B = 51,6 Å; lot C = 45,2 Å.

5. Il est prouvé que le maintien de cette substance dans le torrent circulatoire s'explique par les dimensions de la molécule de dextran en solution qui dépassent celles des pores du filtre rénal.

6. Les solutions de dextran doivent avoir un poids moléculaire et un R_{Es} qui puissent assurer leur maintien dans le torrent sanguin pendant un temps utile, sans se prolonger toutefois au point de déterminer l'apparition d'anticorps spécifiques ou des réactions de dépôt. D'après nos données, la valeur optime serait aux environs de 90—110 Å de diamètre et le R_{Es} compris entre 45—55 Å.

BIBLIOGRAPHIE

1. PAPPENHEIMER J. R., RENKIN E. M. et BORRERO L. M. — Am. J. Physiol., 1951, **67**, 13.
2. BAYLISS L. E. KERRIDGE P. M. et RUSSEL D. S. — J. Physiol., 1933, **77**, 386.
3. RICHARDS A. N. et BOTT P. A. — J. Biol. Chem., 1941, **141**, 291.
4. MARSHALL M. E. et DEUTSCHE A. M. — Am. J. Physiol., 1950, **163**, 461.
5. HUEPER W. C. — Arch. of Path. 1942, **33**, 1.

6 Ingelman B. et Halling M. S. — Ark für Kemi Mineral. Geol. 1949, **1,** 61.
7 Friberg V., Graff W. et Aberg B. — Scand. J. Clin. e lab. invest., 1951, **229,** 221.
8 Mark H. — In der Teste K. Vorträge a.d. Tag. d. ph. Gesell. Zürich-Leipzig 1938.
9 Wallenius G. — Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1954, Suppl. 4.
10 Hulburt H. M., Herman R. A., Tobolsky A. V. et Eyring H. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 1943, **44,** 371.
11 Flory P. J. — J. Chem. Physics. 1944, **12,** 425.
12 Eşanu G., Banc S., Weinbach R., Haas H. et Stavri D. — Rev. Ig. Mic. Epid., 1956/1. 55.
13 Einstein A. — Ann. de Phys., 1905, **17,** 549.
14 Eşanu G., Czopp H., Stavri D., Banc S. et Hörer O. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 467.
15 Kabat E, A. et Bezer A. E. — VIIth Int. Congress f. Microbiol., 1958, p. 203.
16 Maurer P. — Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 1957, **96,** 394.

ЭФФЕКТИВНЫЙ РАДИУС ДИФФУЗИИ (R_{ES}) МОЛЕКУЛЫ ДЕКСТРАНА; ЗНАЧЕНИЕ ДАННОГО РАДИУСА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В данной работе представлены определения эффективного радиуса диффузии (R_{ES}) секулы декстрана, изготовленного при помощи штамма *Leuconostoc mesenteroides* № 4, зированного, в нашей стране. Эффективный радиус диффузии определялся по смуле, предложенной Эйнштейном

$$R_{ES} = \frac{RT}{6\pi\eta\ DN}$$

Эффективный радиус диффузии (R_{ES}) для серий декстрана, применяемого в кли-не, обладающих молекулярным весом в 70.000±20.000, равнялся 45—51 Å

Подчеркивают значение определения этой цифры для толкования комплексных явле-, обеспечивающих сохранение в циркуляторном потоке данного заместителя в течении лежащего срока времени с терапевтической точки зрения, и в то же время недолго, для чтоб избежать фиксацию в тканях или появление специфических антител. Согласно ным авторов отличительные цифры для декстрана, являются следующими: молекуляр-ı вес 70.000 ± 20.000 и R_{ES} = 45—55Å

ÜBER EFFEKTIVE DIFFUSIONSRADIUS (R_{ES}) DES DEXTRANMOLEKÜLS UND SEINE BEDEUTUNG

ZUSAMMENFASSNUG

In der vorliegenden Arbeit werden die Bestimmungen des effektiven Diffusionsradius, $_{ES}$) beim Molekül des mit dem hierzulande isolierten Stamm *Leuconostoc mesenteroides* . 4 hergestellten Dextrans wiedergegeben. Der effektive Diffusionsradius wurde nach der mel von Einstein bestimmt:

$$R_{ES} = \frac{RT}{6\pi\eta\ DN}$$

Bei den für klinischen Gebrauch bestimmten Dextranserien mit Molekülargewichten 70.000 ± 20.000, betrug der effektive Diffusionsradius (R_{ES}) 45—51 Å.

Es wird gezeigt, welche Bedeutung der Bestimmung dieses Wertes für das Verständnis komplexen Phänomene zukommt, die das Verbleiben des Substituenten in der Blutbahn hrend einer Zeitspanne gewährleisten, die therapeutisch ausreichend und doch genügend tz ist, damit keine Fixierung in den Geweben und keine Antikörperbildung zustande komme. n Daten dem Verfasser zufolge, wären die Optimalwerte für Dextran: Molekulargewicht 000 ± 20.000 und R_{ES} = 45—55 Å.

THE EFFECTIVE DIFFUSION RADIUS (R_{ES}) OF THE DEXTRAN MOLECULE AND ITS IMPORTANCE

SUMMARY

The determinations of the effective diffusion radius (R_{ES}) of dextran molecules are reported as performed in dextran prepared with the *Leuconostoc mesenteroides* strain No. 4 isolated in this country. The effective diffusion radius was determined according to Einstein's formula:

$$R_{ES} = \frac{RT}{6\pi\eta\, DN}$$

In dextran batches as supplied for clinical use, with molecular weights of 70.000 ± 20.000, the effective diffusion radius was found to be 45—51 Å.

It is emphasized that determinations of this figure are of considerable importance for an understanding of the complex phenomena owing to which the substituent is maintained in the blood stream for the period required from the therapeutic standpoint, yet sufficiently brief to avoid fixation in the tissues, or specific antibody formation. According to the data of the author, optimal values for dextran would be: molecular weight 70.000 ± 20.000 and R_{ES} = 45—55 Å.

ONNÉES CONCERNANT L'APPLICATION DE LA « MÉTHODE DE BLOCAGE » DANS LA PRÉPARATION DE CERTAINS SÉRUMS DE DIAGNOSTIC

par

N. Olinici, Sofia Lescinschi, en collaboration avec Alexandrina Ivaşco.

ravail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Laboratoire de Contrôle scientifique des produits [biologiques à l'usage de la pratique vétérinaire).

— Manuscrit reçu le 14 mai 1960 —

Afin d'obtenir des sérums strictement spécifiques il serait souhaitable dadopter pour la production de grandes quantités de sérum, des techniques us simples qui puissent remplacer l'adsorption, méthode habituellement orieuse.

Dans ce but, nous avons expérimenté la méthode de blocage, préconisant l traitement de l'antigène avec un sérum immun(c hoisi spécialement) avant noculation aux animaux, ce qui pourraité viter l'apparition des anticorps de oupe (1, 2) et présume: *a)* la combinaison « in vitro » des anticorps avec les oupes déterminants de l'antigène, qui impriment les caractères de groupe x sérums; *b)* la persistance de ce blocage « in vivo »; *c)* conservation de la pacité de l'antigène de produire des anticorps strictement spécifiques.

Le traitement des microbes avec divers sérums immuns et normaux — non s dans le but poursuivi par nous, mais en vue de diminuer la toxicité — a é largement appliqué au cours de la préparation des soi-disant « vaccins sensi- isés » (3,4,5,6,7,8,9). Les données concernant les anticorps apparus la suite de l'administration de germes « sensibilisés » sont généralement très ntradictoires; certains auteurs observent unei nhibition totale de l'apparition certains anticorps, alors que d'autres constatent des titres élevés (10,11). s contradictions qui prédominent dans le problème des vaccins sensibilisés, ont terminé Olitzki (1) de reprendre les expériences sur les rats et de recommander, tre autres, la méthode du « blocage des antigènes » dans la préparation des rums agglutinants. Anatolii (2) applique cette méthode avec des résultats tisfaisants, en vue d'obtenir des sérums spécifiques sur lapins.

Les difficultés rencontrées dans la préparation des sérums adsorbés nous t déterminé à essayer, à notre tour, le blocage des antigènes, surtout que les rcherches dans ce sens sont peu nombreuses dans la littérature et que nous ne sposons point d'indications suffisantes sur la portée de la valeur decette méthode.

Matériel et méthodes. Les souches de *Salmonella* et *Shigella* utilisées proviennent de erses collections internationales (Instituts d'État de Copenhague, Prague et Paris), les sérums nt préparés sur lapins pesant entre 2 et 3 Kg.

Méthode de blocage: à la suspension de 1 milliard germes/ml on a ajouté du sérum natif immun en proportion de 1/1, correspondant aux groupes déterminants de l'antigène que nous voulons bloquer. Le mélange est maintenu pendant 2 heures, à l'étuve, en agitant continuellement et ensuite à +4°C, durant 16 heures. La suspension est centrifugée, le surnageant est enlevé et les germes resuspendus dans du sérum physiologique, jusqu'à la concentration de 1 milliard/ml (2). Dans d'autres expériences, le blocage sus-mentionné a été parfois répété les jours suivants, avec le même sérum immun, ou des sérums de composition différente. Par répétition du blocage avec un sérum de même composition, on a obtenu dans quelques essais préliminaires des résultats semblables, soit en renouvellant chaque fois le sérum, soit en utilisant le même sérum pour les blocages ultérieurs. Le fait que ce dernier ne soit préalablement dilué et que le mélange comprenne une très petite quantité de microbes, explique, dans le cas de l'emploi répété, la conservation de la capacité blocante du sérum. Les lapins ont été inoculés à 4 jours d'intervalle avec: 0,5, 1, 1,5 et 2 ml de suspension microbienne, en poursuivant la dynamique de l'apparition des anticorps. Parallèlement, on a immunisé des lapins avec les mêmes antigènes, non bloqués. Le titrage en tubes, des sérums anti-somatiques a été effectué à l'aide d'antigènes alcoolés ou vivants et, sur lame, avec des souches vivantes âgées de 18 heures, cultivées sur gélose inclinée. Les tubes d'agglutination étaient maintenus pendant 20 heures au bain-marie à 52°. Les sérums anti-flagellaires ont été titrés avec des antigènes formolés. Lecture après 2 heures à 52°. La saignée à blanc des lapins avec titres correspondants a été faite le 8-e—10-e jour après la dernière injection.

L'Institut « Dr. I. Cantacuzino » prépare pour l'usage des divers laboratoires, des sérums agglutinants anti-*Salmonella*, non-adsorbés. Les sérums anti-somatiques AO (1, 2, 12), BO (4, 5, 12) et TO901 (9, 12) contenant la même agglutinine anti-12, peuvent parfois créer des difficultés d'interprétation, comme d'ailleurs les sérums anti-flagellaires para A (1, 2, 12; a), anti-typhi-murium (1, 4, 5, 12; i) et anti-*Gärtner* (1, 9, 12; gm), qui contiennent des agglutinines anti-somatiques. Ainsi, le sérum anti-flagellaire para A agglutine à un titre élevé — en tube et sur lame — des souches de *S. typhi;* le sérum anti-typhi-murium agglutine les souches de S. para B et le sérum anti-*Gärtner*, les souches de *S. typhi*. Dans le but d'atténuer ces impédiments, le standard de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » a prévu la préparation du sérum anti-flagellaire « b » avec une souche de *S. Minnesota* (21; b) du groupe LO, le sérum anti-flagellaire « d » étant préparé avec la souche S. *Virginia* (8; d) du groupe CO. Toutefois, les confusions (surtout par agglutination sur lame) demeurant possibles, imposent — à défaut de sérums adsorbés — le procédé de l'agglutination en tube. Tenant compte des faits susmentionnés, nous avons essayé le « blocage » des antigènes pour la préparation des sérums qui produisent certaines difficultés d'interprétation, tels les sérums: anti-AO, anti-BO, anti-TO901, anti-flagellaires a, i et gm. A l'aide de la même méthode, on a essayé la préparation d'un sérum anti-somatique *Salmonella* 5 et de quelques sérums anti-dysentériques *Flexner* de type et de groupe.

RÉSULTATS

Sérum anti-AO (1, 2, 12). Le blocage a été essayé dans une première expérience, en vue d'éliminer l'agglutinine anti-12. Nous reviendrons ailleurs sur l'agglutinine anti-1. Deux lapins (Nos. 1 et 2) ont été immunisés avec un antigène préparé avec la souche para A_1, bouillie et traitée selon la méthode de blocage, d'abord avec sérum anti-somatique para BO (4, 5, 12) préparé avec la souche para « BO form », et ensuite avec sérum anti-somatique TO901. Deux lapins (Nos. 3 et 4) ont été immunisés avec un antigène AO, en répétant 6 fois le blocage avec le sérum anti-TO 901, deux autres lapins (Nos. 5 et 6) inoculés avec un antigène AO, bloqué 6 fois avec du sérum anti-TO901 et encore 6 fois avec le sérum anti-para BO. Trois lapins (Nos. 7, 8 et 9) ont été inoculés avec antigène AO non bloqué. Les résultats sont exposés dans le tableau I.

Il ressort de ce tableau, que le titre anti-TO901 dépasse chez deux des trois lapins témoins, le titre anti-AO, le titre anti-BO étant plus réduit. En traitant une seule fois l'antigène AO avec le sérum anti-BO et anti-TO901, on n'a pas obtenu une modification évidente des titres anti-BO et anti-TO901 (cas du lapin No. 1), en échange, le lapin No. 2 a donné des titres généralement bas. En traitant 6

s l'antigène AO avec le sérum anti-TO901, on constate une certaine diminution anticorps anti-BO et anti-TO901, chez le lapin No. 4, mais avec baisse du titre i-AO chez le lapin No. 3. En répétant 6 fois le blocage avec le sérum anti-901 et 6 fois avec le sérum anti-BO, la formation d'agglutinines est totalement ibée (lapins No. 5 et 6). En conclusion, il n'a pas été possible — dans le cas sent — d'obtenir à l'aide de cette méthode, un sérum qui agglutine uniquement la souche de S. para A.

Tableau I

Sérum anti-para AO

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »						Titres des sérums des lapins témoins		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
para AO alcoolé	1:1600	1:160	1:200	1:600	—	—	1:800	1:600	1:800
para BO alcoolé	1:160	1:20	1:40	1:80	—	—	1:80	1:160	1:640
TO 901 alcoolé	1:640	1:20	1:320	1:160	—	—	1:160	1:640	1:1280

*Sérum anti-*BO (4, 5, 12); Deux lapins (Nos. 1 et 2) ont été immunisés avec un antigène éparé de la souche « BO form », bouillie et traitée d'abord avec sérum anti-AO, et ensuite ec sérum TO901. Deux lapins (Nos. 3 et 4) ont été immunisés avec antigène BO, répétant fois le blocage avec sérum anti-TO901 et deux autres lapins (Nos. 5 et 6) immunisés avec tigène BO, traités 6 fois avec sérum anti-TO901, ensuite 6 fois avec sérum anti-AO. Trois oins (Nos. 7, 8, 9) ont été immunisés avec antigènes non-bloqués. Les résultats sont nsignés dans le tableau II.

Tableau II

Sérum anti-para BO

ntigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »						Titres des sérums des lapins témoins		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
para BO alcoolé	1:1600	1:3200	1:400	1:800	—	—	1:6400	1:3200	1:6400
para AO alcoolé	1:10	—	—	1:10	—	—	1:40	1:20	1:20
TO 901 alcoolé	1:80	1:10	1:40	1:160	—	—	1:2560	1:2560	1:1280

De ce tableau il résulte que le titre anti-TO901 des sérums témoins est élevé, dépassant (chez le lapin No. 8) de la moitié, le titre anti-BO. Les titres anti-AO sont très bas. Le traitement de l'antigène BO une seule fois avec le sérum anti-AO et TO901 a réduit les titres anti-AO et TO901 maintenant des valeurs élevées pour le titre anti-BO. La même baisse des titres anti-AO et TO901 est observée chez les sérums obtenus avec l'antigène traité 6 fois avec sérum anti-TO901, mais cette-fois avec une légère baisse du titre anti-BO. Après 6 blocages avec le sérum anti-TO901 et 6 avec le sérum AO, la production des agglutinines est totalement inhibée. En conclusion, par le blocage de l'antigène BO, dans certaines conditions, on peut obtenir un sérum avec des agglutinines anti-AO et anti-TO (agglutinines 12) à titre bas.

Sérum anti-TO901 (9, 12). Les lapins Nos. 1 et 2, sont immunisés avec antigène préparé avec la souche TO901, bouilli et traité avec sérum anti-BO et ensuite avec sérum anti-AO. Les lapins Nos. 3 et 4 sont immunisés avec antigène TO901, traité 6 fois avec sérum anti-BO; deux autres lapins (Nos. 5 et 6) sont inoculés avec antigène TO901 bloqué 6 fois avec sérum anti-BO et 6 fois avec sérum anti-AO. Les lapins Nos. 7, 8, 9 sont inoculés avec antigène TO901, non-bloqué. Les résultats sont notés dans le tableau III.

Tableau III

Sérum anti-TO 901

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »						Titres des sérums des lapins témoins		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
S. TO 901 alcoolé	1:12800	1:12800	1:4800	1:3200	—	—	1:51200	1:38400	1:6400
S. para AO alcoolé	1:10	1:10	—	—	—	—	1:80	1:10	1:20
S. para BO alcoolé	1:40	1:160	1:160	1:80	—	—	1:1280	1:640	1:80

Il résulte de ce tableau que le titre anti-AO et anti-BO des sérums témoins est relativement bas. En traitant l'antigène TO901 une seule fois avec le sérum anti-AO et BO, on obtient une baisse du titre anti-AO et anti-BO, le titre anti-TO901 n'étant pas sensiblement modifié. Après avoir appliqué 6 fois la méthode du blocage avec le sérum anti-BO, on obtient une légère baisse du titre anti-TO901. Répétant le blocage 6 fois avec le sérum anti-BO et AO, l'apparition des agglutinines est totalement inhibée. En conclusion, les sérums obtenus par un nombre réduit de blocages présentent des titres AO et BO plus bas que les témoins qui, à leur tour, ne présentent pas des titres élevés, par rapport aux mêmes anticorps.

Sérum anti-somatique 5 Salmonella. Deux lapins (Nos. 1 et 2) sont immunisés avec un antigène préparé avec la souche « BO form » bouilli et traité une seule fois avec sérum anti-Essen (4, 12); deux lapins (Nos. 3 et 4), sont inoculés avec un antigène BO, traité 6 fois avec

même sérum, à intervalle d'un jour. Deux lapins (Nos. 5 et 6) sont immunisés avec un anti-e BO, non-bloqué. Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Tableau IV

Sérum anti-somatique 5 Salmonella

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »				Titres des sérums des lapins témoins	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
para BO alcoolé	1:800	1:400	1:80	1:40	1:3200	1:1600
Essen alcoolé	1:400	1:400	1:40	1:40	1:3200	1:1600

De ce tableau il ressort que par cette méthode on n'a pu obtenir un sérum anti-somatique 5, qui tout en agglutinant la souche « BO form » (4, 5, 12) ne contienne plus des agglutinines anti-Essen (4, 12).

Sérum anti-flagellaire para A *(a)*. L'antigène a été préparé avec la souche AH 1015, cultivée 6 heures en bouillon et inactivée au formol. Le blocage a été effectué 6 fois avec le sérum anti-AO et l'antigène inoculé aux lapins Nos. 1 et 2; deux autres lapins (Nos. 3 et 4) sont immunisés avec un antigène non-bloqué. Les résultats sont indiqués dans le tableau V

Tableau V

Sérum antiflagellaire para A (a)

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »		Titres des sérums des lapins témoins	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
para AH formolé	1:32000	1:8000	1:24000	1:32000
para AO alcoolé	1:20	1:20	1:1250	1:2560
para BO alcoolé	1:10	1:10	1:40	1:80
TO 901 alcoolé	1:10	1:40	1:2560	1:1250

D'après les données de ce tableau, les titres anti-somatiques des sérums moins sont élevés, surtout en ce qui concerne les agglutinines anti-AO et TO901, lors que le titre anti-BO est très bas. Le blocage de l'antigène AH avec un sérum anti-AO, a fortement réduit les valeurs des titres anti-somatiques anti-AO, BO et TO901.

Sérum anti-typhi murium (i). L'antigène a été préparé avec la souche *S. typhi murium* 1074, cultivée 6 heures en bouillon et inactivée au formol. Une partie de l'antigène a été bloquée une seule fois avec le sérum anti-BO et inoculée aux lapins Nos. 1 et 2; une autre partie traitée 6 fois avec le même sérum et inoculée aux lapins Nos. 3 et 4, alors que les lapins Nos.5 et 6 ont été immunisés avec l'antigène non-bloqué. Les résultats figurent dans le tableau VI.

Tab'eau VI

Sérum anti-typhi murium (i)

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »				Titres des sérums des lapins témoins	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
S. typhimurium formolé	1: 48000	1: 48000	1: 32000	1: 48000	1: 48000	1: 6000
S. para AO alcoolé	1: 10	—	—	—	1: 20	1: 20
S. para BO alcoolé	1: 640	1: 40	1: 20	1: 10	1: 1600	1: 5120
S. TO 901 alcoolé	1: 640	1: 10	1: 20	1: 10	1: 1600	1: 1280

Ce tableau prouve que les titres anti-somatiques des sérums témoins sont élevés, surtout en ce qui concerne les agglutinines anti-BO et TO901, tandis que le titre anti-AO est bas. Les titres anti-somatiques diminuent considérablement à la suite d'un seul, et même après 6 blocages, cas où le sérum est presque totalement dépourvu d'agglutinines anti-somatiques, sans avoir subi pour cela des modifications du titre anti-flagellaire.

Sérum anti-Enteritidis Gärtner (gm). L'antigène a été préparé avec la souche No. 5168, cultivée 6 heures en bouillon et inactivée au formol. Une épreuve d'antigène a été traitée une seule fois avec le sérum anti-TO901 et inoculée aux lapins Nos. 1 et 2. Une autre épreuve, traitée 6 fois avec le même sérum, a été inoculée aux lapins Nos. 3 et 4. Les lapins Nos. 5 et 6 ont été immunisés avec l'antigène non-bloqué. Les résultats sont présentés dans le tableau VII.

Du tableau VII il résulte que les titres anti-somatiques des sérums témoins sont élevés seulement pour les agglutinines anti-TO901. A la suite du blocage, les titres anti-somatiques baissent surtout après avoir répété 6 fois le traitement de l'antigène, sans influencer le titre anti-flagellaire. Toutefois, les résultats ne peuvent être comparés à ceux obtenus par la préparation du sérum anti-flagellaire a et i. Spécialement sur lame, les sérums continuaient à agglutiner à un titre élevé, la souche TO901. Le même phénomène a été constaté pour les sérums anti-para A, obtenus avec des antigènes non-bloqués. Bien que testé en tube, le titre agglutinant du sérum concernant l'antigène TO901 était nettement inférieur au titre anti-flagellaire respectif, sur lame ce même titre anti-TO901 était très élevé, atteignant des valeurs embarrassantes pour le diagnostic des souches contenant l'antigène somatique 9, 12. Les autres sérums présentent générale-

nt un parallélisme des titres sur lame et en tube. Dans le cas présent, à défaut ce parallélisme, on a répété, en plus de l'antigène alcoolé, les agglutinations tube avec un antigène vivant TO901.

Tableau VII

Sérum anti-Enteritidis Gärtner (gm)

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »				Titres des sérums des lapins témoins	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
Enteritidis Gärtner ormolé	1:48000	1:24000	1:48000	1:48000	1:24000	1:48000
para AO alcoolé	1:10	1:10	—	1:10	1:20	1:20
para BO alcoolé	1:40	1:20	—	1:80	1:20	1:80
TO 901 alcoolé	1:1280	1:640	1:160	1:640	1:10240	1:5120
TO 901 vivant	1:1280	1:1280	1:320	1:1280	1:10240	1:10240

Cette fois-ci, les titres étaient plus élevés, démontrant l'avantage de l'essai du locage avec un sérum agglutinant préparé à l'aide d'une culture vivante xpérience qui cependant n'a pas été effectuée).

Dans le but d'obtenir un sérum anti-flagellaire gm à titre anti-somatique bas, n a maintenu une épreuve d'antigène Gärtner formolé en contact prolongé ec le sérum anti-TO901 (2 semaines à la température du laboratoire, avec termittence de 2 heures par jour à 37°), sans obtenir d'antigène bloqué, mais, r contre, un phénomène de zone. En appliquant la méthode du blocage à 2°, on obtient des sérums à titres anti-flagellaires plus bas, sans que les titres nti-somatiques en soient sensiblement diminués. Dans ce cas, le titre du sérum our la souche S. TO901 vivant et alcoolé marque une différence très nette. Les sultats sont notés dans le tableau VIII.

La congélation-décongélation de l'antigène Gärtner formolé ou vivant, vant traitement par le sérum blocant, ne contribue point à l'obtention de sérums titres anti-TO901 négligeables.

Des résultats tout aussi peu satisfaisants ont été obtenus lors d'un blocage 'antigène Gärtner formolé avec sérum anti-somatique Gärtner. Le comporte- ent particulier du sérum anti-Gärtner (gm) qui conserve son titre élevé nti-TO901 dans les conditions des essais de blocage sus-mentionnées, nous incité à entreprendre la préparation d'un sérum anti-flagellaire avec une souche 'un autre groupe somatique « O », c'est-à-dire S. Essen (4, 12; gm) formolé, raité au sérum anti « BO form ». Dans ce cas, non plus, il ne nous a été possible 'obtenir un sérum dépourvu d'agglutinines anti-somatiques ou qui les contienne un titre bas. D'autres expériences avec la souche *Gärtner* rough, sont en cours.

Tableau VIII

Sérum anti-Enteritidis Gärtner (gm) préparé avec un antigène où le blocage a été essayé à 52° et prolongé à la température du laboratoire avec intermittence à 37°

Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués » pendant 2 semaines à la T. du laboratoire.		Titre des sérums des lapins inoculés avec antigènes « bloqués » à 52°	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
S. Enteritidis Gärtner formolé	1:5120	1:20480	1:1280	1:2560
S. TO 901 alcoolé	1:12,0	1:640	1:640	1:320
S. TO 901 vivant	1:1280	1:640	1:2560	1:1280

Sérum anti-california. L'antigène est préparé avec la souche S. California SK104, cultivée 6 heures en bouillon et inactivée au formol. Le blocage a été effectué en traitant 6 fois, l'antigène avec le sérum anti-flagellaire Gärtner (gm). On a inoculé deux lapins avec l'antigène ainsi traité et deux autres avec l'antigène non-bloqué. Dans ces conditions, on n'a pas obtenu un sérum anti-flagellaire t, agglutinant la souche S. California (4, 12; gm t) et non la souche S. Enteritidis Gärtner (1, 9, 12; gm).

Sérums anti-dysentériques Flexner de type et de groupe.

Pour la préparation de ces sérums à l'aide de la méthode d'adsorption, nous nous sommes guidés d'après les indications de SEELIGER (12), RAUSS (13), KAUFFMANN (14) et EDWARDS et EWING (15).

Sérum de type I. Dans le cas des sérums adsorbés, l'immunisation des lapins (dans la production courante) est effectuée avec une souche de type 1a et l'adsorption du sérum, avec un antigène 2a et y; c'est la raison pour laquelle le blocage de l'antigène 1a a été essayé avec des sérums de type 2a et y. Les lapins Nos. 1 et 2, ont été inoculés avec un antigène traité une seule fois avec ces sérums, deux autres lapins (Nos. 3 et 4) inoculés avec un antigène traité 6 fois avec chaque sérum et deux autres (Nos. 5 et 6) avec antigènes non-bloqués.

Sérum de type II. L'immunisation des lapins, dans le cas des sérums adsorbés, est effectuée avec une souche de type 2b et l'adsorption du sérum avec un antigène 1a et x, raison pour laquelle l'antigène 2b a été bloqué avec des sérums de type 1a et x. Les lapins Nos. 1 et 2 sont inoculés avec un antigène traité une seule fois avec ces sérums, deux lapins (Nos. 3 et 4) avec un antigène traité 6 fois avec chaque sérum et deux autres (Nos. 5 et 6) avec antigènes non-bloqués.

Sérum de type III. L'immunisation des lapins, dans le cas des sérums adsorbés, est effectuée avec une souche de type 3a et l'adsorption du sérum avec un antigène 1b (éventuellement 4b) et x; c'est pourquoi on a essayé le blocage de l'antigène 3 avec sérums de type 1b et x. Les lapins Nos. 1 et 2 sont inoculés avec un antigène traité une seule fois avec ces sérums, et deux autres (Nos. 3 et 4) avec antigènes non-bloqués.

Sérum de type K (4a spécifique). Dans le cas de sérums adsorbés, l'immunisation des lapins est effectuée avec une souche de type 4a, en phase spécifique, l'adsorption du sérum avec un antigène 1a et x éventuellement 4a « groupe », c'est pourquoi le blocage de l'antigène 4a spécifique a été essayé avec les sérums de type 1a et x. Les lapins Nos. 1 et 2 sont inoculés avec antigène traité une seule fois avec ces sérums et deux autres (Nos. 3 et 4) avec antigènes non-bloqués.

Sérums $IV_1 - IV_2$ (4a groupe). L'immunisation des lapins, dans le cas des sérums adsorbés, est effectuée avec une souche 4a groupe, l'adsorption avec un antigène 1a et x, et le blocage de l'antigène 4a groupe avec le sérum de type 1a et x, respectivement. Deux lapins (Nos. 1 et

ont inoculés avec un antigène traité une seule fois avec ces sérums et deux autres (Nos. 3) avec antigènes non-bloqués.

Sérum de type V. L'immunisation, dans le cas des sérums adsorbés, est effectuée avec souche de type 5x —, et l'adsorption du sérum avec antigène 1a et x. Le blocage de l'antigène ype 5 a été essayé respectivement avec sérums de type 1a et x. Deux lapins (Nos. 1 et 2) inoculés avec antigène traité une seule fois avec ces sérums; deux lapins (Nos. 3 avec antigène traité 6 fois avec chaque sérum; et les lapins Nos. 5 et 6 avec antigènes bloqués.

Sérum de type VI. Dans le cas des sérums adsorbés, l'immunisation des lapins est effec- avec une souche de type 6 (Newcastle ou Manchester), l'adsorption du sérum avec anti- 1a (éventuellement 2a et y); pour le blocage de l'antigène de type 6 on a utilisé un sérum ype 1a. Deux lapins (Nos. 1 et 2), ont été inoculés avec antigène traité une seule fois avec érum; deux autres lapins (Nos. 3 et 4) ont été inoculés avec un antigène traité 6 fois avec érum et deux lapins (Nos. 5 et 6) avec des antigènes non-bloqués.

Sérum de groupe 3, 4. Pour les sérums adsorbés, les lapins ont été immunisés soit avec souche de type 2a et adsorption du sérum avec antigène 2b, soit avec la variante y et adsorp- du sérum avec antigène x. Nous avons utilisé pour le blocage un antigène y traité une fois sérum x. Les lapins Nos. 1 et 2 ont été inoculés avec cet antigène et deux autres (Nos. 3) avec antigènes non-bloqués.

Sérum de groupe 7,8 (9). L'immunisation des lapins (cas de sérums adsorbés) est effectuée avec une souche de type 2b et adsorption du sérum avec antigène 2a, soit avec une souche ante x, et adsorption du sérum avec antigène 1b et y (éventuellement 2a). On a employé r le blocage un antigène x traité une fois avec les sérums 1b et y. Deux lapins s. 1 et 2) ont été inoculés avec cet antigène et deux autres (Nos. 3 et 4) avec antigènes -bloqués.

Sérum de groupe 6. Dans le cas des sérums adsorbés, l'immunisation des lapins est effectuée ituellement avec une souche de type 1b et l'adsorption avec un antigène 1a. Deux lapins s. 1 et 2) ont été inoculés avec un antigène traité une seule fois avec le sérum la et deux es (Nos. 3 et 4) avec un antigène traité 6 fois avec ce sérum, enfin deux autres (Nos. 5 et 6) antigènes non-bloqués.

Tous les antigènes Flexner ont été inactivés par chauffage (1 heure à 100°), avant traite- nt avec les sérums respectifs, étant donné que les cultures vivantes exigent, pour un éven- blocage, de plus grandes quantités de sérum (1, 2). Les titrages ont été faits avec des ches vivantes, les tubes d'agglutination étant maintenus 18 heures à 52°. On a utilisé pour blocage, des sérums non-adsorbés. Les résultats sont consignés dans les tableaux IX et X.

Il résulte de ces tableaux que pour ces sérums, nous nous sommes heurtés mêmes difficultés de blocage que pour les sérums anti-somatiques Salmo- la. Toutefois, on entrevoit, dans certains cas (sérum de type I, II, III, V, VI groupe 3, 4), le blocage partiel des groupes visés. Un des sérums de type et un autre de type V présentent une baisse considérable des agglutinines groupe. Une différence marquée entre les sérums anti-dysentériques et sérums anti-somatiques Salmonella est représentée par le blocage total des tigènes somatiques Salmonella avec obtention de sérums dépourvus de titre, ns le cas de blocages répétés, alors que pour les antigènes Flexner, la répétition blocage, dans les mêmes conditions, ne diminue généralement, que dans e très petite mesure, la capacité de produire des anticorps spécifiques. Seuls rtains sérums anti-Flexner présentent une perte plus accentuée de l'aggluti- ne, qui devrait se maintenir au même titre élevé, à la suite du blocage (un sérum type I et un sérum de type II).

En attendant de progrès plus substantiels en ce qui concerne la structure time des antigènes en cause et des anticorps respectifs, la méthode d'adsorption meure actuellement la seule applicable pour la préparation des sérums de type de groupe Flexner.

Tableau IX

	Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »				Titres des sérums des lapins témoins	
		No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6
Sérum type I	1 a vivant	1:6400	1:1600	1:200	1:6400	1:6400	1:1600
	2 a vivant	1:400	1:1200	1:100	1:400	1:400	1:800
	var. y vivant	1:1600	1:1600	1:400	1:6400	1:3200	1:6400
Sérum type II	2 a vivant	1:800	1:400	1:800	1:200	1:3200	1:1600
	2b vivant	1:3200	1:1600	1:800	1:400	1:6400	1:6400
	1 a vivant	1:200	1:200	1:20	1:20	1:1600	1:800
	var. x vivant	1:200	1:100	1:20	1:20	1:1600	1:3200
Sérum type V	5 vivant	1:6400	1:6400	1:800	1:3200	1:3200	1:3200
	1 a vivant	1:800	1:400	1:20	1:400	1:1600	1:400
	var. x vivant	1:400	1:800	1:20	1:800	1:3200	1:800
Sérum type VI	6 vivant	1:12800	1:6400	1:3200	1:3200	1:3200	1:6400
	1 a vivant	1:800	1:1600	1:40	1:200	1:400	1:800
	1 b vivant	1:400	1:400	1:20	1:100	1:400	1:400
Sérum groupe 6	1 b vivant	1:6400	1:6400	1:400	1:800	1:12800	1:12800
	1 a vivant	1:6400	1:1600	1:400	1:1600	1:12800	1:6400

DISCUSSION

A la suite des résultats obtenus, la méthode de blocage s'est montrée appropriée pour la production de certains sérums agglutinants, remplaçant avec succès les méthodes d'adsorption, dans le cas des sérums anti-flagellaires Salmonella a et i. Les désavantages de la méthode d'adsorption, susceptibles de nous faire préférer celle du blocage des antigènes pour la préparation de certains sérums, sont les suivants:

a) La méthode d'adsorption est plus coûteuse, vu qu'elle exige une grande quantité de culture microbienne; la méthode du blocage exclut les antigènes adsorbants.

b) La méthode d'adsorption est beaucoup plus laborieuse, impliquant la préparation des antigènes adsorbants, leur centrifugation, le mélange antigène-sérum, centrifugation du mélange et éventuellement adsorbtions répétées. Le filtrage appliqué parfois en vue de la stérilisation du sérum peut conduire à des diminutions importantes des titres. L'utilisation de trop grandes quantités d'antigènes adsorbants, ainsi que des infections microbiennes survenant au cours des expériences, peuvent également influencer et même dégrader le sérum. Etant donné les risques des infections secondaires, il est recommandable d'ajouter des substances préservantes utilisées aussi comme facteurs stérilisants, lorsque

Tableau X

	Antigène de titrage	Titres des sérums des lapins immunisés avec antigènes « bloqués »		Titres des sérums des lapins témoins	
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
érum type III	3 vivant	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200
	1 b vivant	1:400	1:400	1:1600	1:1600
	var. x vivant	1:400	1:400	1:800	1:800
érum 4 a péci- iques	4 a sp. vivant	1:3200	1:6400	1:12800	1:1600
	4 a gr. vivant	1:200	1:200	1:200	1:400
	1 a vivant	1:400	1:400	1:1600	1:400
	var. x vivant	1:400	1:400	1:1600	1:400
Sérum + a gr.	4 a gr. vivant	1:3200	1:6400	1:3200	1:3200
	1 a vivant	1:12800	1:3200	1:6400	1:12800
	var. x vivant	1:3200	1:1600	1:3200	1:3200
Sérum groupe 3,4	var. y vivant	1:6400	1:6400	1:6400	1:1600
	2 a vivant	1:400	1:800	1:3200	1:400
	var. x vivant	1:400	1:800	1:3200	1:3200
	2 b vivant	1:200	1:400	1:400	1:800
Sérum groupe 78(9)	var. x vivant	1:1600	1:3200	1:3200	1:6400
	2 b vivant	1:800	1:800	1:1600	1:6400
	var. y vivant	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400
	2 a vivant	1:200	1:200	1:400	1:3200
	1 b vivant	1:200	1:400	1:800	1:400

l'adsorbtion est faite avec des germes vivants. Les manoeuvres très simples de la méthode de blocage nous dispensent de l'emploi de ces préservants.

c) Les sérums adsorbés étant généralement dilués, expirent au bout de quelques mois à un an. Les sérums préparés avec des antigènes bloqués sont des sérums natifs et conservent longtemps leur efficacité (3 à 6 ans au minimum), en fonction du titre initial, des conditions de conservation, de l'espèce du sérum, etc. Lorsqu'on observe une baisse du titre, due au vieillissement, ces sérums demeurent utilisables en dilutions plus réduites (agglutination sur lame). La perte du titre du sérum adsorbé, ne permettant ce rajustement, rend ce dernier définitivement inutilisable.

Pour le prolongement de l'efficacité, les sérums adsorbés peuvent être lyophilisés, avec précaution, en présence du saccharose, gélatine, etc. La lyophilisation des sérums préparés par la méthode de blocage n'implique pas l'addition de ces substances, les sérums étant natifs.

S'il s'agissait de distribuer aux divers laboratoires des sérums natifs, préparés avec des antigènes bloqués, comme dans le cas de tous les sérums natifs, il serait recommandable que leur dilution — en vue des agglutinations sur lame — soit faite avec du sérum physiologique contenant 1/4—1/5 glycérine neutre pure. Dans ces conditions, le sérum obtenu reste efficace plus d'une année à +4°, si la dilution recommandée par le laboratoire de production est inférieure au titre réel, ce qui est préférable dans le cas des sérums obtenus par la nouvelle méthode. Le sérum préparé à l'aide de la méthode de blocage ne doit être utilisé que pour agglutinations sur lame, l'agglutination en tube étant inutile, comme dans le cas des sérums adsorbés, ce qui simplifie et facilite le diagnostic. Les instructions de l'emploi des sérums agglutinants anti-Salmonella et anti-dysentériques, préparés à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » prévoient la dilution des sérums natifs non-adsorbés avec du sérum physiologique phéniqué, sans addition de glycérine. En considérant la courte durée de l'efficacité de ces dilutions et le fait que ces sérums sont employés en grandes quantités pour des agglutinations en tubes, il est facile d'apprécier les avantages du remplacement de certains sérums par ceux qui, préparés par la méthode du blocage, présentent en plus, une stricte spécificité.

Malheureusement, d'après les résultats obtenus, cette méthode ne peut être appliquée en mesure égale pour la préparation de tous les sérums agglutinants. Alors que cette méthode a donné de bons résultats dans la préparation de quelques uns des sérums anti-flagellaires Salmonella, dans d'autres cas, il a été impossible (dans nos conditions de travail) d'obtenir par cette même méthode, des sérums avec un titre anti-somatique négligeable. Les antigènes dysentériques Flexner et flagellaires Salmonella ont conservé, dans le cas de blocages répétés, la capacité de produire des anticorps spécifiques, les sérums bénéficiant généralement de cette répétition. En échange, un nombre égal de blocages appliqués aux antigènes somatiques anti-Salmonella, ont souvent donné des sérums totalement dépourvus de titres agglutinants. Les sérums anti-somatiques Salmonella, préparés par cette méthode, conservent, après un ou plusieurs blocages, des agglutinines indésirables, à un titre élevé, à l'exception du sérum anti-BO, où le blocage de l'antigène est évident. Les antigènes somatiques Salmonella utilisés dans cette expérience, apparaissent donc: soit comme faiblement accessibles au blocage des groupes déterminants visés (dans le cas d'un ou plusieurs blocages), soit comme accessibles au blocage de tous les groupes, voire même de ceux qui ne sont pas visés, dans le cas de blocages répétés. Il est toutefois possible que le sérum anti-BO ne représente pas une simple exception, le blocage pouvant

appliqué aussi à d'autres sérums anti-somatiques Salmonella. Les antigènes ntériques Flexner, également somatiques, ne paraissent non plus accessibles locage au cours de la préparation des sérums de type et de groupe. A l'excep- du sérum anti-Flexner de type II, III, V et VI et de groupe 3, 4, où les s du blocage sont plus ou moins visibles, pour les autres sérums, l'antigène as été modifié dans le sens souhaité, même en cas de blocages répétés, les s des diverses agglutinines de type et de groupe demeurant très élevés. NHOFF (16) s'est heurté aux mêmes difficultés de blocage, en préparant des gènes Flexner pour la réaction sérologique de Widal (dysenterie). On constate t aux sérums anti-flagellaires Salmonella, une indication plus large de plication de la méthode du blocage, surtout que le risque de la adation des antigènes flagellaires en présence des sérums anti-somatiques iste pas.

Les données obtenues démontrent en plus, la possibilité de blocage total vitro » des agglutinogènes, même en utilisant des sérums qui ne présentent t d'aires réceptrices pour tous les groupes antigéniques. OLITZKI (1) prouve, contre, que le blocage « in vitro » n'est guère possible sans que les germes nt préalablement soumis à la congélation-décongélation ou à la désinté- ion phagique. Cependant, si l'on considère que cet auteur, dans ses expéri- s, n'a répété le blocage qu'une seule fois, il est facile de comprendre la diffé- e des résultats.

En ce qui concerne la possibilité d'appliquer sur une plus grande échelle locage des antigènes soumis à la congélation-décongélation, nous ne pouvons clure que ce fait puisse constituer une règle générale. Dans quelques essais ctués sur 13 antigènes, dont deux flagellaires (suspensions S. Gärtner vivantes ormolées) et 11 somatiques (antigènes bouillis) BO, TO901, Flexner type 5237, A. Sartorius, 1946b (2b), 4a groupe, type 5x — 223, type 5 x — 5245, 6 Newcastle, L.! Sartorius et variante x (VII Weil), la congélation-décon- tion a été répétée 10 fois, sans réaliser un blocage nettement supérieur à i obtenu habituellement avec les germes tués par chauffage ou au formol. ès desintégration partielle ou totale des microbes, il subsiste de la structure génique initiale — peu connue dans l'étape actuelle — les configurations favorisent ou entravent le phénomène de blocage. Considérés de ce point vue, les essais ont un caractère purement empirique. Des progrès substan- s d'immunochimie bactérienne sont nécessaires pour expliquer le comporte- nt si différent des antigènes, dans le cas du blocage. En plus, des recherches es dans ce sens conduiront, ainsi qu'il a été montré par STAUB et coll.(17) s une étude immunochimique sur certaines Salmonella, à la réalisation d'une thèse des oligosides spécifiques, à la suite de laquelle il sera possible « de pré- er de manière plus élégante et plus rapide », des sérums spécifiques mono- epteurs.

Comparant les résultats obtenus avec les mêmes antigènes sur des lapins munisés, on constate souvent une réactivité variant d'un animal à l'autre, ce arrive d'ailleurs au cours de toutes les immunisations effectuées avec divers igènes.

Le blocage « in vivo » par inoculation répétée des sérums immuns respectifs cours de l'immunisation, étant trop coûteux, n'a pas été essayé. Cette inocu- on pourrait favoriser le blocage, en l'association avec la méthode usuelle (1).

Le comportement de l'antigène « bloqué » « in vivo », ainsi que le contrôle de la structure antigénique des microbes traités avec des sérums blocants seront discutés dans un travail ultérieur. Ce contrôle servirait à apprécier les possibilités de bloquer les antigènes microbiens, utilisés pour la préparation de certains « antigènes de diagnostic » dont l'amélioration est parfois souhaitable (comme dans le cas de la réaction Widal).

La diversité des résultats de la littérature quant aux titres des anticorps obtenus après administration des vaccins sensibilisés pourrait s'expliquer par les conditions très différentes dans lesquelles a été effectuée la « sensibilisation ». Ainsi, les possibilités de « blocage » peuvent varier d'une espèce à l'autre. Les antigènes des germes vivants exigent de plus grandes quantités de sérum, par rapport à ceux des germes tués (1, 2). Le procédé d'inactivation mène à l'apparition ou disparition de certains antigènes, fait dont il faut tenir compte au cours de la « sensibilisation ». Le comportement des antigènes flagellaires diffère de celui des antigènes somatiques. Les sérums utilisés par les auteurs pour la « sensibilisation », varient d'une expérience à l'autre, tant du point de vue qualitatif que quantitatif. La période de contact des antigènes avec les anticorps sensibilisants influence, plus ou moins, l'apparition des divers anticorps. Ajoutons qu'un certain antigène « sensibilisé » peut perdre ses qualités d'agglutinogène, tout en conservant celles de produire des anticorps fixateurs et des bactériolysines (18). Appliquant la méthode de blocage à d'autres espèces bactériennes, il serait possible d'obtenir — comme dans le cas des Salmonella — des résultats permettant d'éviter l'adsorption au cours de la préparation des sérums strictement spécifiques.

RÉSUMÉ

On a essayé la méthode du blocage des antigènes dans la préparation de sérums agglutinants de diagnostic anti-Salmonella et anti-dysentériques. L'emploi de cette méthode est limité à certains sérums. Ainsi, les sérums anti-flagellaires Salmonella a et i, préparés à l'aide de la méthode de blocage, sont comparables aux sérums adsorbés respectifs, s'avérant même supérieurs, du point de vue rendement, alors que d'autres sérums anti-flagellaires (ex.: Enteritidis Gärtner 9,12, gm et Essen, 4, 12 gm) présentent à la suite du blocage des antigènes, des agglutinines anti-somatiques à un titre élevé. Les antigènes somatiques Salmonella ont gardé, en grande partie, — à la suite d'un ou plusieurs blocages, — la capacité de produire des anticorps de groupe, la répétition des blocages pouvant conduire à l'obtention de sérums dépourvus de titre. Cependant, le sérum anti-B0 a bénéficié du blocage préalable de l'antigène. La méthode de blocage ne peut remplacer la méthode d'adsorption en ce qui concerne les sérums anti-Flexner de type et de groupe, la baisse des titres visés ayant été constatée seulement chez le sérum de type II, III, V, VI et groupe 3, 4.

Le comportement des antigènes Flexner a été différent de celui des antigènes Salmonella, dans le sens qu'à la suite de blocages répétés, on n'a pas obtenu des sérums dépourvus de titre agglutinant.

La congélation-décongélation de l'antigène n'a pas influencé de manière assez évidente la possibilité du blocage.

La diversité des résultats en ce qui concerne les anticorps apparus après dministration de vaccins « sensibilisés » peut s'expliquer par la variété des espèces iologiennes utilisées et des conditions de travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Olitzki L. — J. Immunol., 1935, **29,** 453.
2. Anatolii C. A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Imunobiol., 1957, No. 7, 100.
3. Levy E. et Hamm A. — Münch. Med. Wschrft., 1909, **56,** 1728.
4. Besredka A. — Bull. Inst. Pasteur, 1910, **8,** 241.
5. Metchnikoff El. et Besredka A. — Ann. Inst. Pasteur, 1911, **25,** 193 et 865 — Ibid. 1913, **27,** 537.
6. Ciucă M., Combiesco D. et Balteanu J. — C. R. Soc. Biol., 1914, **76,** 753.
7. Ciucă M., Combiesco D. et Balteanu J. — Ann. Inst. Pasteur, 1915, **29,** 105.
8. Busson B. — Wien. Klin. Wschrft., 1915, **28,** 853.
9. Boehnke P. D. — Med. Klin., 1917, **13,** 1082.
10. Olinici N. — Vaccinarea antitifică — Ref. Gen. Inst. Cantacuzino, 1952, 32.
11. Olinici N. — Vaccinarea antidizenterică — Ref. Gen. Inst. Cantacuzino, 1954, 44.
12. Seeliger H. — Die Laboratoriumsdiagnostiken der Bakterienruhr. — Ed. Ambrosius Barth, 1953, Leipzig.
13. Rauss K. — Dysenteria Müvelt nep. Tudomanyos és ismeretterjesztö kiado, Budapest, 1955.
14. Kauffmann F. — Enterobacteriaceae — 1954. 2-nd ed. Munksgaard, Copenhagen.
15. Edwards P. R. et Ewing W. H. — Identification of Enterobacteriaceae — Burgess Publ. Comp. Minneapolis, 1957.
16. Bernhoff F. G. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1945, Nr. 4—5, 64.
17. Staub A. H., Tinelli R., Luderitz O. et Westphal O. — Ann. Inst. Pasteur, 1959, **96,** 303.
18. Lowy O. — Deutsch. Med. Wschrft., 1915, **41,** 1277.

ДАННЫЕ ПО ПРИМЕНЕНИЮ «МЕТОДА БЛОКИРОВАНИЯ» ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментировали метод блокирования антигенов при изготовлении агглютинирую- диагностических сывороток против салмонелл и дизентерийных палочек. Применяе- ь данного метода ограничивается для определенных сывороток. Так, в то время как ивожгутиковые сыворотки а и против салмонелл, изготовленные при помощи метода ирования могут быть сравнены с соответствующими адсорбированными сыворотками, ие противожгутиковые сыворотки, как например enteritidis Gä.tner (9, 12, gm) и Эссен gm) проявляют после блокирования антигенов антисоматические агглютины в высо- титре. После однократного или повторных блокирований соматические антигены сал- лл сохранили в значительной степени пособность спорождать групповые антитела, при многократные блокирования ведут к получению сывороток, лишенных титра. Все же, изготовлении сыворотки Во, предварительное блокирование антигена сказалось поло- ельно на сыворотке. Метод блокирования не в состоянии заменить метод адсорбции для кснеровских типовых и групповых сывороток. Снижение намеченных титров наблю- сь только для сывороток типа II, III V, VI и группы 3,4.

Флекснеровские антигены вели себя иначе, чем антигены салмонелл, в том смысле что е повторных блокирований не получаются сыворотки без титра, а наоборот, сыворотки унизированных животных обладают в общем высокими титрами соответствующих вых и групповых агглютининов, из-за чего, с редкими исключениями метод не ективен.

Замораживание и оттаивание антигена перед блокированием не имело выраженного ния на возможности блокирования. Разнообразность результатов, во что касается анти- появляющихся после введения «сенсибилизированных» вакцин — может объясняться ообразностью видов и условий работы.

ANGABEN ÜBER DIE ANWENDUNG DER „BLOCKIERUNGSMETHODE" BE DER HERSTELLUNG EINIGER DIAGNOSTISCHEN SERA

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methode der Antigenblockierung wurde versuchsweise bei der Herstellung einige diagnostischen agglutinierenden Salmonella- und Dysenteriesera angewendet. Die Anwend barkeit des Verfahrens ist auf bestimmte Sera beschränkt. So können a und i Geisselsera gege Salmonellen, die nach der Blockierungsmethode hergestellt wurden, mit den entsprechende adsorbierten Sera durchaus verglichen werden, ja sie sind diesen hinsichtlich der Rentabilit sogar überlegen.

Hingegen weisen andere Geisselsera, z.B. gegen *Enteritidis Gärtner* (9, 12 gm) und *Esse* (4, 12 gm) die nach dem gleichen Verfahren hergestellt wurden, somatische Agglutinine i hohem Titer auf. Die somatischen Salmonellaantigene behielten nach einer oder mehrere Blockierungen weitgehend ihre Fähigkeit gruppenspezifischer Antikörper hervorzurufe bei; die Bildung sehr oft wiederholter Blockierung führte zu titerlosen Sera. Immerhin erwie sich die vorausgehende Blockierung des Antigens beim BO-Serum als günstig. Die Blockie rungsmethode kann die Adsorptionsmethode bei typen-und gruppenspezifischen Flexnersen nicht ersetzen. Abnahmen der entsprechenden Titer wurden nur bei den Typensera II, III V, VI und bei dem Gruppenserum 3,4 beobachtet.

Flexnerantigene verhielten sich anders als Salmonellaantigene, indem nach wiederholte Blockierung nicht titerlose Sera erhalten wurden, sondern im Gegenteil, Sera mit sehr hohe Titern der entsprechenden Typen- und Gruppenagglutinine. Mit einigen Ausnahmen ergib sich daraus die Umwirksamkeit der Methode.

Das Einfrieren und Auftauen des Antigens vor der Blockierung übte auf die Blockie rungsmöglichkeit keinen offenbaren Einfluss aus. Die Manigfaltigkeit der Ergebnisse hinsicht lich der Antikörper, die nach der Verabreichung von sensibilisierten Impfstoffen auftreten kann durch die Verschiedenartigkeit der Spezies und der Arbeitsbedingungen erklärt werden

SOME DATA CONCERNING THE APPLICATION OF THE "BLOCKING METHOD" TO THE PREPARATION OF DIAGNOSTIC SERA

SUMMARY

An attempt was made to apply the method of antigen blocking to the preparation o anti-Salmonella and anti-dysenteric agglutinating sera. This method is suitable for certain sera only. Thus, whereas Salmonella a and i anti-flagellar sera prepared according to th blocking method are comparable with the respective adsorbed sera and even display certain advantages concerning their profitableness, other anti-flagellar sera, i.e. *Enteritidis Gärtne* (9, 12 gm) and *Essen* (4, 12 gm) sera prepared by means of blocked antigens contain anti-somati agglutinins in high titres. After one or several repeated blocking the somatic Salmonella antigen maintain to a large extent their ability of inducing group-antibody formation, while whe blocking is repeated a great many times the sera obtained have no titre at all. However, i the case of anti-BO serum previous blocking of the antigen exerted a favourable influenc on the serum. The blocking method cannot substitute the adsorption method in the case o typing and grouping anti-Flexner sera. Decreases of the respective titres were only recorde in the case of type II, III, V, VI and group 34 sera.

Flexner antigens differed from Salmonella antigens, in as much as after repeated blockin the titres of the sera were not reduced to zero, but on the contrary the sera of immunize animals as a rule contained large amounts of the respective type- and group agglutinins. Thu with a few exceptions, the method is inefficient in these cases.

Freezing and thawing of the antigen before blocking exerted no obvious influence o the latter. The diversity of the results as regards the antibodies formed after the administratio of "sensitized" vaccines may be accounted for by the variety of species and workin methods used.